

Über den Einfluß von nativem Kollagen
auf den Zellzyklus
(Untersuchungen an humanen Fibroblasten in vitro)

Dieter Müller

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem
INSTITUT FÜR TIERANATOMIE
Lehrstuhl für Histologie und Embryologie der Tiere
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. P. Walter

Über den Einfluß von nativem Kollagen auf den Zellzyklus
(Untersuchungen an humanen Fibroblasten in vitro)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München



von
Dieter Müller
aus
Heidenheim

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan : Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent : Prof. Dr. P. Walter

Korreferent : Prof. Dr. D. Stavrou

Tag der Promotion : 24. Juli 1981



DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung	1
B.	Experimentelle Untersuchungen	4
	I. Material und Technik	
	a) Material	4
	b) Technik	6
	II. Ergebnisse	21
C.	Diskussion	55
D.	Zusammenfassung	59
E.	Summary	60
F.	Literaturverzeichnis	61

A. Einleitung

Die Fibroblasten sind Bestandteile des Stützgewebes und Vorstufe der Fibrozyten. Als noch nicht voll ausdifferenzierte Zellen beteiligen sie sich an der Bildung der geformten Interzellulärschubstanz, auch stehen sie im Dienste der Regeneration geformter und ungeformter Bindegewebe.

Die Synthese von Kollagen erfolgt in diesen Zellen. Dabei können drei Stufen unterschieden werden:

1. An den Ribosomen: Polypeptid-Synthese der sog. α Ketten des Protokollagens unter RNA Steuerung. Die häufigste Sequenz der Aminosäuren: Glycin-Prolin-Prolin. Prolin wird unter Anwesenheit von Ascorbat zu Hydroxy-Prolin umgesetzt. Analog: Lysin-Hydroxy-Lysin. Diese primären Produkte existieren in zwei Varietäten als α_1 und α_2 Ketten mit einem MG von 100.000.

2. Ablösung von den Ribosomen

Durch Assoziation von zwei α_1 - und einer α_2 - Kette entsteht eine rechtsdrehende Superhelix. Sodann wird eine prosthetische Kohlenhydrat-Gruppe angeheftet - auf ihr beruht der KH-Gehalt von etwa 2 % des Kollagens.

Das Endprodukt der intrazellulären Synthese stellt das stäbchenförmige Prokollagen dar (Länge 2.800 Å, Durchmesser 15 Å, MG 300.000), es befindet sich in den ergastoplasmatischen Zisternen der Fibroblasten. Wie das Prokollagen nun in den extrazellulären Raum sezerniert wird, ist noch strittig.

3. Nach erfolgter Sekretion

wird zuerst ein N-terminales Peptid abgespalten, es entsteht das extrazelluläre, säurelösliche, monomere Kollagen. Die Fibrillenbildung geschieht durch Seit-zu-Seit und End-zu-End Anlagerung unter Ausbildung kovalenter Bindungen. (Prockop D.J. et al. 1973; Schwarz W., Merker H.J., Kutzsche A. 1961; Buddecke E. 1974).

Heute unterscheidet man mehrere biochemische und von dem Ort des Vorkommens her verschiedene Kollagentypen. (Zusammenfassung bei Piec. K.A. 1976).

Typ I: Hauptsächlichster Bestandteil des Hautkollagens, einziger Kollagentyp in Knochen und Sehnen.

Ketten-Zusammensetzung $[\alpha_1(I) \quad] \quad \alpha_2 \quad (\alpha_1(I) \text{ und } \alpha_2 \text{ sind identisch.})$
2

Typ II: (Miller + Matukas 1969, Miller 1973) Im hyalinen Knorpel vorkommend, drei identische Ketten $\alpha_1(II)_3$

Typ III: (Miller 1971)

Manchmal auch als "Ersatzkollagen" bezeichneter Hauptbestandteil von Blutgefäßen, daneben auch in der Haut, drei Ketten $[\alpha_1(III)]_3$.

Typ IV: (Kefalides 1973)

Enthalten in "basement-membranes" sowie in capsula lentis, Descemet'scher Membran und in den Glomerula.

Für Fibroblasten in vitro gilt eine Synthese von Kollagen Typ I und Typ III als gesichert (Church R.L., Tanzer M.L., Lapiere C.M. 1973; Byers P.H., Smith B.D., Martin G.R., 1975).

Durch Reaktion von Typ I - bzw. Typ III - spezifischen Antikörpern gelang sogar der Nachweis, daß die Synthese der beiden verschiedenen Typen gleichzeitig erfolgt (Gay S., Martin G.R., Müller P.K., Timpl R., Kühn K., 1976).

Die Wirkung von nativem Kollagen auf lebende Zellen ist bisher nicht nachgewiesen. Lediglich eine Untersuchung über seinen Einfluß auf den Zellzyklus (Walter P. und Feder F., 1979; unveröffentlichte Institutsarbeit) weist eine deutliche Verlängerung der G_1 - Phase nach.

B. Experimentelle Untersuchungen

I. MATERIAL UND TECHNIK

a) MATERIAL

1. Fibroblasten Die Fibroblasten wurden von der Firma Seromed bezogen. Sie stammten aus menschlichen Embryonen; bei den Versuchen Nr. 1 bis 18 aus solchen der Lunge, bei den Versuchen Nr. 19 bis 23 aus Hautmuskel-Bindegewebe. Erstere trugen die Bezeichnung FH 58; letztere die Bezeichnung FH 66.
2. Kollagenlösungen Die Kollagenlösungen stellte dankenswerterweise die Firma Heyl & Co., Berlin, zur Verfügung.
 - a) S I - Lösung
Kollagenlösung ohne Zusatz
 - b) S II - Lösung
Kollagenlösung wie a) unter Zusatz von 0,5 % Citratpuffer und 0,5 % Phenonip
 - c) S III - Lösung
Kollagenlösung wie a) ohne jegliche Konservierungsmittel
 - d) S IV - Lösung
Kollagenlösung wie a) unter Zusatz von 0,5 % Phosphatpuffer und 0,5 % Phenonip
 - e) S V - Lösung
Kollagenlösung wie a) unter Zusatz von 0,5 % Phosphatpuffer ohne Konservierungsmittel

f) Typ I - Lösung

Gereinigte Kollagenlösung, die den Kollagen-
typ I zu 90 % enthält

g) Typ IV Lösung

Gereinigte Kollagenlösung, die den Kollagen-
typ IV zu 90 % enthält, unter Zusatz von
Citratpuffer und Konservierungsmittel

- | | |
|-----------------|--|
| 3. Citratpuffer | Citratpuffer |
| 4. PBS | Phosphate Buffered Saline
nach Dulbecco und Vogt (1954)
Literatur: siehe dort |
| 5. STV | Trypsin Versen Lösung
Bestehend aus Trypsin Stammlösung und
Äthylen-di-amin-tetra-Essigsäure (EDTA)
Literatur: Marcus P.I.; Cierciura S.J. (1956) |
| 6. GAH | Glutardialdehyd der Firma Merck, Art. 4239
angewandt in 2 % Lösung |
| 7. Waschlösung | Natriumcacodylat 0,15 mol (Di-methyl-arsin-
säure-Natriumsalz-Tri-hydrat $C_2H_6AsNaO_2 \cdot 3H_2O$) |
| 8. Medium | Für Anzucht und Erhaltung wurde das gleiche
Medium verwendet.
Minimal Essential Medium (MEM) modifiziert
nach Earle. |

Zusätze: 10 % fetales Kälberserum
8,8 % Natrium-bi-carbonat Lösung
10 mg/ml Phenolrot als pH Indikator
100 IE Penicillin G pro ml
100 µg Di-hydro-streptomycin pro ml
0,5 ml Amphotericin Lösung pro Liter
Literatur: Earle W.R.

9. Brutschrank Temperatur 37 Grad Celsius
unter Zugabe von 5 % CO₂ zur atmosphärischen
Luft
10. Gefäße Sterile Petrischälchen 60 x 15 mm "standard
dish" Lux Scientific Corporation, Newbury Park
Calif. USA Catalog No. 5220
11. Zellfärbung Nach Giemsa
Giemsa Stammlösung : Methanol = 1 : 1
Färbezeit: 30 Sekunden
12. Mikroskopische
Präparate Objektträger 3 x 1 inch
Deckgläschen 26 x 20 mm
Eindeckelung mit Entellan

b) TECHNIK

1. Allgemeines zur Behandlung der Zellkulturen

Die Fibroblasten sind in Zellkulturen - wie alle auf diese Weise ge-
züchteten Zellen - hochempfindlich gegenüber jeglicher Verunreinigung,

Besonders groß ist die Kontaminationsgefahr mit Bakterien und Pilzen. Sämtliche Manipulationen erfolgten daher mit sterilem Gerät auf einer sterilen Werkbank. Eine Luftumwälzungseinrichtung führte ständig durch bakteriendichte Filter geleitete Frischluft zu.

2. Anlagen der Subkulturen

Die Zellen wurden in flachen Plastikflaschen mit Mediumzusatz geliefert. Das Medium wird zuerst mit Hilfe einer Glaspipette durch Unterdruck vorsichtig abgesaugt.

Zum Lösen der Fibroblasten von den Gefäßwänden eignet sich STV, welches zuvor auf 37⁰ Celsius erwärmt wurde. Einige Milliliter STV werden in die Plastikflasche pipettiert; dann behutsam geschüttelt. Anschließend Absaugen und erneute Zugabe von fünf Milliliter STV. Vorteilhaft ist es, danach für ein bis drei Minuten bei 37⁰ Celsius im Brutschrank zu inkubieren. Die vollständige Ablösung der Fibroblasten kann durch ein Phasenkontrastmikroskop kontrolliert werden. Sind die Zellen abgelöst, 25 ml Medium mit 10 % Kälberserum - Zusatz hinzugeben. Damit wird die Wirkung von Trypsin-Versen gestoppt. Anschließend die Zellen mittels Pipette im Medium suspendieren. Um die Fibroblasten möglichst wenig zu schädigen, wurde auf das sonst übliche Zentrifugieren bewußt verzichtet. Nach kurzem Stehenlassen kann das überstehende Medium ebensogut dekantiert oder abgesaugt werden.

Das Fibroblasten-Sediment wird nun in neues Nährmedium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt.

3. Zellzählung bei Humanen-Fibroblasten

Trypanblaufärbung: Es wird eine 1 % Trypanblaulösung in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Davon werden 0,5 ml mit 1 ml der Zellsuspension gemischt.

Die Zählung erfolgt in einer Liquorzählkammer nach Fuchs-Rosenthal. Mayr (1974) empfiehlt 16 kleine Felder jeweils diagonal vorgehend auszählen; diese entsprechen einem großen Quadrat zu 1 mm³ Inhalt.

Formel zur Berechnung der benötigten Suspensionsmenge für 1 ml des vorliegenden Zellsediments.

$$\text{Verdünnungsfaktor/Sediment} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times 5 \times 1000 \times \text{Verdünnung der Zellen}}{\text{gewünschte Zellzahl}}$$

Die Zellzahl wird auf 500.000 Fibroblastenzellen pro ml eingestellt, indem die errechnete Menge Medium hinzugefügt wird.

Literatur: Mayr A., Bachmann P.A., Bibrack B., Wittmann G. (1974).

Die so eingestellte Zellsuspension wurde nun auf neue Kulturgefäße verteilt.

Bei längerer Versuchsdauer ist es nötig, alle drei Tage zu subkultivieren, und frisches Medium zuzusetzen. Die im Versuch eingesetzten Zellen halten dabei ein "Alter" zwischen der 12. und 17. Subkultur-Passage, welches sich hinsichtlich der Zellvermehrungs- und Wachstumseigenschaften als optimal herausgestellt hatte.

4. Ansetzen der Versuche

Jeweils fünf Milliliter der oben hergestellten Fibroblasten-Zellsuspensionen werden in sterile Plastik-Petrischälchen mit Deckel pipettiert. Es ergibt sich somit eine Ausgangskonzentration von 2,5 Millionen Fibroblasten pro Schälchen.

Die von der Firma Heyl & Co., Berlin, bezogenen Kollagenlösungen wurden immer in gleicher Menge von 0,2 ml/Schälchen zugesetzt. Auf den Boden jeder Petrischale wurde vor dem Beschicken außerdem ein sterilisiertes Deckgläschen gelegt, so daß sich auf dessen Oberfläche ein Fibroblasten-Zellrasen bildete.

5. Aufbau der Versuche

Die Versuchsreihen wurde in gleicher Weise siebenfach angelegt; wobei jeder einzelne Ansatz doppelt erfolgte. Die jeweils entsprechenden sieben Parameter ergaben einen Mittelwert, sowie die dazugehörige Standardabweichung. Die Rechenarbeiten erfolgten mit einem programmierten Taschencomputer T I 59; der Standardabweichung lag die N-1 Gewichtung zu Grunde.

Für die vorliegende Arbeit gelangten insgesamt sieben Versuchsblöcke zur Durchführung.

Die einzelnen Blöcke umfaßten zwei bis zu sechs Testreihen; am Beginn stand immer eine Fibroblasten-Reihe ohne Zusatz jeglicher Kollagenlösungen; sie sollte in ihrem Zellzyklus-Verhalten die Ausgangswerte liefern, mit denen sodann die Werte bzw. Verschiebungen im Zellzyklus, nach Hinzugabe von Kollagen-Lösungen, verglichen wurden.

6. Zeitlicher Ablauf

In den Versuchen waren die Zellen nicht synchronisiert, d.h. sie befanden sich nach zufälliger Verteilung in den Zellzyklusstadien G_1 , S, G_2 , M (Howard A., Pelc S.R., 1953).

Lediglich die Ausgangszellzahl von 2,5 Millionen Fibroblasten pro Probe zum Zeitpunkt der Einsaat lag fest. Um dennoch zu vergleichbaren Parametern zu gelangen, wurden die zusammengehörigen Fraktionen stets nach gleich konstanten Zeiträumen der Inkubation dem Brutschrank entnommen, fixiert und gefärbt. Die Entnahmezeiten lagen bei 4 - 8 - 12 - 24 - 36 und 48 Stunden, gemessen ab Einsaat (entsprechend Zeitpunkt 0).

Somit ergab sich ein Bild von der wechselnden Verteilung in den Zellzyklusphasen mit zunehmender Zeit.

7. Weiterbehandlung der Fibroblasten

Nach Entnahme aus dem Brutschrank wurde das überstehende Medium aus den Schälchen abgegossen, kurz mit Phosphate-Buffered-Saline gespült und nach zweimaligem Nachspülen mit Aqua-bi-dest. fünf Milliliter Glutardialdehyd (GAH 2 %ig) hinzugegeben.

So vorbehandelt blieben die Proben sechs Stunden im Kühlschrank liegen. Anschließend wurden - nach Entfernen des GAH - fünf Milliliter Natriumcacodylat-Waschlösung (siehe Material 7.) unter Zusatz von 0,2 mol (= 68,4 g) Saccharose pro Liter hinzugefügt, und erneut sechs Stunden gekühlt.

Nachfolgend wurde zweimal mit Aqua-bi-dest. gespült und mit Giemsa-Farblösung exakt 30 Sekunden gefärbt.

Mit einer Pinzette wurde das in der Petrischale liegende Deckgläschen gefaßt, in 70 % Alkohol und Aqua-bi-dest. von überschüssiger Farblösung befreit, und - mit dem angewachsenen Fibroblasten-Rasen nach oben - bei Zimmertemperatur getrocknet.

Das fertige mikroskopische Präparat erhielt man durch einfaches Aufkleben des Deckgläschens-Zellrasen nun nach unten-auf einen Objektträger mittels Entellan.

8. Lichtmikroskopische Auswertung

Bei 400-facher Vergrößerung erfolgte die Differenzierung jedes einzelnen Fibroblasten hinsichtlich seiner Zellzyklusphase nach morphologischen Charakteristika (siehe: Morphologie der Fibroblasten).

So identifiziert wurden pro Präparat genau einhundert Fibroblasten, wobei jedes Bildfeld vollständig bis zum Erreichen der Marke 100 durchgemustert wurde.

Die Einteilung des Zellzyklus wurde nach $G_1 - S - G_2 + M$ vorgenommen. Zusätzlich wurden noch tote und abgekugelte Zellen erfaßt.

Wesentlich erleichterte die Verwendung eines programmierbaren Taschencomputers die statistische Auflistung. Dies gestattete, für jedes der fünf Kriterien eine eigene Tastenfunktion mit automatisch saldierenden Speicher einzurichten - also ein Führen von Strichlisten zu umgehen. Es konnte so das mikroskopische Bild ständig im Auge behalten werden, indem die Tasten nach Gewöhnung blind betätigt wurden.

9. Darstellung der Ergebnisse

Auf geschilderte Weise erhält man für jeden der gewählten Zeitpunkte eine prozentuale Auflistung der aktuellen Verteilung im Zellzyklus. Zur plastischeren Demonstration und zum Vergleich werden die Ergebnisse in ein zweidimensionales Koordinatensystem übertragen. (Abszisse: Funktion der Zeit; Ordinate: Anzahl von Zellen in Hundert).

Morphologische Bestimmung der Zellzyklusphasen von Fibroblasten

Vorbemerkung

Die bis heute angewandte Unterteilung des Zellzyklus in G_1 - S - G_2 - M Phasen beruht auf den Arbeiten von Howard und Pelc (1953). Bestimmendes Merkmal sind hierbei die zyklisch ablaufenden Prozesse der DNA Synthese, der identischen DNA Reduplikation und schließlich der mitotischen Zellteilung.

Seitdem erschienen eine Unzahl von Veröffentlichungen über die Teilphasen des Zellzyklus, und deren methodischer Bestimmung. Im Wesentlichen werden zwei Verfahren angewandt: Erstens die Gruppe der Autoradiographischen Verfahren, d.h. der Markierung der DNA z.B. mit H^3 -Thymidin (Koburg und Maurer, 1962), und zweitens die neueren Verfahren der Impulszytrophotometrie nach Anfärbung mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen (Reiffenstuhl G., 1971 oder Latt S.A., George Y.S., Gray J.W., 1977).

Dank dieser Arbeiten liegen für nahezu alle Zellarten - einschließlich der Fibroblasten - genaue Angaben über die Generationszeiten und Teilphasen des Zellzyklus vor.

Das in dieser Arbeit gewählte morphologische Klassifizieren der Zellzyklusphasen besticht vor allem durch seine Einfachheit, leichte Durchführbarkeit und seinen bescheidenen Aufwand. Gleichwohl dürfte es für größere Zellzahlen weniger in Betracht kommen.

Das Verfahren nützt einige charakteristische Veränderungen des Zellleibes, seines Kernes und der Anfärbbarkeit der Zelle aus - wohl wissend, daß alldem die bekannten Veränderungen der DNA zu Grunde liegen.

Ausdrücklich sei hervorgehoben, daß die Zuordnung der fließenden Übergänge von G_1 in S und $G_2 + M$ in drei starre Kompartimente problematisch ist, jedoch in dieser hier vorliegenden Problemstellung durchaus gute und wie die Standardabweichungen beweisen auch signifikante Ergebnisse liefert.

Allgemeine Richtlinien zur Bestimmung der Zellzyklusphasen

Der Beurteilung liegen mikroskopische Bilder bei 400-facher Vergrößerung zu Grunde.

Die Kriterien lassen sich in Charakteristika des Zellkernes, des Zytoplasmas und solche der Gestalt des Zelleibes unterteilen.

G_1 - Phase

- Die G_1 - Phase schließt sich der Mitose an, und dauert bis zum Beginn der identischen Reduplikation der DNA (Howard A. + Pelc S.R., 1953)
- Der Gehalt an DNA im Kern beträgt $2n$. (Schneidl W., 1969)
- Eine weitere Unterteilung in G_1 - Phase und G_0 - Phase nehmen manche Autoren vor (z.B. Quastler M., 1963)

a) "Neue" G_1 - Phase

Hier findet der Proliferationsstoffwechsel ausdifferenzierter Zellen statt.

Als Ausdruck der funktionellen Aktivität des Kernes werden Zunahme des Kernvolumens, vermehrte Auflockerung des Chromatins und ansteigende Nucleolus-Größe beschrieben.

b) G_0 - Phase

Dient nur dem Erhaltungs- und Funktionsstoffwechsel.

- Kernmembran

Eine "lichtmikroskopische" Kernmembran ist deutlich ausgebildet. Sie entsteht durch den Chromatinbesatz der inneren Kernmembran (Band C.A., 1959) - also dem Haften bestimmter Chromosomenorte an dieser Stelle. Eine Kernmembran wird immer dann gebildet, wenn verquellende Chromosomen (nach einer Mitose) mit Zytoplasma in Berührung kommen.

- Nucleoli

Die Nucleolenzahl pro Kern ist in G_1 am größten und beträgt bei humanen Fibroblasten im Durchschnitt 3,62/Kern,

Die Größe des Nucleolus ist ebenfalls am größten, nimmt aber gegen Ende von G_1 wieder ab (Schnedl W., Schnedl M., 1971).

- Zellkern

Die Größe des Zellkernes ist die geringste im ganzen Zyklusverlauf. Sie beträgt in der frühen G_1 - Phase im Mittel $119 \mu^2$, und steigt gegen Ende G_2 auf $161 \mu^2$ (Schnedl W., Schnedl M., 1971).

Frühe G_1 - Kerne sind demnach viel kleiner als späte G_1 - Kerne. Dieser Anstieg der Kerngröße am Ende der G_1 - Phase geht mit einer besonders starken RNA Synthese, der Synthese eines spezifischen Enzyms einher. Die nachfolgende DNA Reduplikation in der S - Phase ist von einer ausreichenden Menge von m-RNA und Protein abhängig, welche am Ende der G_1 - Phase gebildet werden (Altmann H.W., 1973 (a)). Ohne die Synthese dieser "Starter" m-RNA ist ein Beginn der S - Phase nicht möglich, wie Blockade dieses Schrittes mit Actinomycin D beweist (van't Hof, 1967).

- Zellgröße

Die Zellgröße ist in der G_1 - Phase deutlich am geringsten (Skog S., Eliasson E., Eliasson Eva, 1979)

- Zeitliche Dauer der G_1 - Phase

Die G_1 - Phase ist jene mit den gravierendsten zeitlichen Schwankungen im Zellzyklus. Unterschiedliche Generationszeiten - hier der Fibroblasten - beruhen auf der verschieden langen G_1 - Dauer der Zellen.

In Fibroblasten-Zellkulturen beträgt sie um die 6 Stunden (Schwarzacher H.G., Schnedl W., 1965)

- lichtmikroskopisches Bild (Abb. 24; Abb. 25)

Zelleib:	flächenhaft ausgebreitet, in bizarren Ausläufern endend
Zytoplasma:	schaumige Vakuolen schwach basophil tingiert
Zellkern:	deutliche Kernmembran ein bis mehrere stark basophile Nucleoli Karyoplasma deutlich stärkere Basophilie als Zytoplasma

S - Phase

- Die der G_1 - Phase folgende S - Phase, Synthesephase, ist die erste Phase des eigentlichen Mitosezyklus. Hier findet die identische Reduplikation der DNA statt - nur in diesem Zeitraum wird neue DNA in den Zellkern eingebaut. Deutlich gemacht werden kann dies durch den Einbau von ^3H -Thymidin, welches den Zellen im Medium angeboten wird.
- Die Zunahme des DNA Gehaltes erfolgt proportional von $2n$ auf $4n$, damit verbunden eine entsprechende Volumenvergrößerung der Kerne auf etwa $170 \mu^2$ (Schnedl W., Schnedl M., 1971).
- Die Reduplikation des Heterochromatins erfolgt in jedem Chromosom an letzter Stelle; dabei findet keine vollständige Entspiralisierung der DNA Helix statt, sondern nur ein sogenanntes "Zerstäubungsstadium". Dieses liefert wichtige lichtmikroskopische Anhaltspunkte - manchmal wird auch von körnig aufgelockerten Chromozentren gesprochen (Altmann H.W., 1973 (b)).
- Heterochromatinreiche Kerne unterscheiden sich daher in der S - Phase deutlich von denen der vorausgegangenen G_1 - und nachfolgenden G_2 - Phase (Altmann H.W., 1966) (Müller H.A., 1966). Dem aufgelockerten Zustand des Karyoplasmas der S - Phasen - Kerne entspricht eine Aufrollung der DNA Schraube, welche mit einer Hydratation verbunden ist (Altmann H.W., 1966, s.o.).
- Zeitliche Dauer der S - Phase
Die Zeitspanne der Synthesephase ist bei vielen Zellen auffallend konstant und gleich. Für Fibroblasten werden 9 Stunden angegeben (Schwarzacher H.G., Schnedl W., 1965, s.o.).

- lichtmikroskopisches Bild (Abb. 24; Abb. 26)

- | | |
|-------------|--|
| Zelleib: | - schlanker und langgezogener als in G_1 |
| Zytoplasma: | - Vakuolen verschwunden |
| | - stark basophile Granula, diese können insbesondere auch an den Zellgrenzen auftreten |
| Zellkern: | - typischer "S-Kern" |
| | - starke, basophile Tüpfelung |
| | - deutlicher Nukleolus |
| | - Kernmembran deutlich |
| | - Karyoplasma wesentlich stärker angefärbt als in G_1 . |

G_2 - Phase

- In der anschließenden G_2 - Phase finden keine autotrophen Synthesen statt. Sie dient der Induktion bestimmter Teilungs- bzw. Spindelproteine und geht der Mitose voraus.
- Am Ende der G_2 - Phase erfolgt die Synthese eines spezifischen Enzyms, welches den Start der Prophase auslöst. Dies läßt sich durch Hinzugabe von Puromycin - einer Substanz, die selektiv die Proteinsynthese hemmt - zum Medium beweisen. Hierdurch wird die G_2 - Phase erheblich verlängert (Taylor E.W., 1963).

- Nukleolus

Die Nukleonenzahl ist in G_2 am geringsten. Sie beträgt im Mittel 2,51 pro Zellkern (Schwarzacher W., Schnedl M., 1971).

- Zellkern

Die Kernfläche des Zellkernes ist in G_2 am größten - wie es auch der doppelte DNA Gehalt von $4n$ vermuten läßt. So steigt die Kernfläche von $119 \mu^2$ (G_1) auf eine Fläche von $205 \mu^2$ (G_2). Dies entspricht immerhin einer Zunahme von 72,3 % (Schwarzacher W., Schnedl M., 1971).

- Zeitliche Dauer der G_2 - Phase

Der Zeitraum der G_2 - Phase ist immer nahezu konstant
(Schnedl W., 1969).

Diese Regel gilt auch unter verschiedenen Kulturbedingungen, wieder bestätigt sich die zeitliche Konstanz (Sisken J.E., Kinoshita R., 1961). Im Mittel dauert die G_2 - Phase 5 Stunden (Schwarzacher H.G., Schnedl W., 1965).

- lichtmikroskopisches Bild

Die 4-DNA (=tetraploiden) G_2 - Kerne lassen sich durch subjektive Beurteilung bestimmen. Sie sind allein schon durch ihre Größe und Farbinintensität erkennbar (Schwarzacher H.G., Klinger H.P., 1963).

Diese Aussage hat sowohl für die standardisierte Feulgen-Methode, als auch für die hier angewandte Giemsa Färbung Gültigkeit.

- spindelförmig, schlank, langgezogen
- scharfe Umrisse

- starke Basophilie
- innere Strukturen deshalb nicht erkennbar

Zellkern:

- im Verhältnis zum Zytoplasma deutliche Größenzunahme
- ausgeprägte tiefblaue Anfärbung
- stark angefärbte Nucleoli
- Kernmembran bzw. Kern selbst wegen intensiver Anfärbung des Zytoplasmas oft nicht zu erkennen.

M = Mitose

- Der Beginn der Mitose in der Prophase läßt sich auch lichtmikroskopisch feststellen. Die nun stattfindende Strukturvergrößerung des Interphasekernes spiegelt sich in der Zunahme der Lichtbrechung wider. Ihr Grad ist in den verschiedenen Kern-Arealen unterschiedlich, es treten fädige Strukturen auf.
- Der Nucleolus verschwindet anfangs der Prophase.
- Das Sichtbarwerden der einzelnen Chromosomen kann bei der hier vorliegenden Vergrößerung nicht beobachtet werden.
- In den Fibroblasten Gewebekulturen konnte an der Zellmembran bisweilen eine feine Bläschenbildung beobachtet werden. Es entsteht dabei der Eindruck einer amöboiden Bewegungsweise in der Art, daß die soeben geteilten Tochterzellen voneinander wegkriechen.
- Hervorzuheben bleibt, daß die mitotischen Zellen die Eigenschaft aufweisen, sich abzukugeln, und frei im Nährmedium suspendiert zu schweben. Dies soll durch bioelektrische Veränderungen des Oberflächenpotentials hervorgerufen werden (Dietel und Mauersberger, 1962). Teresima T. und Tolmach L.J. (1963) nutzten diesen Effekt aus, um durch Gewinnung in der Mitose abgekugelter Zellen Hela Zellkulturen auf schonende Weise zu synchronisieren. Beim Auswerten der Versuche wird folglich nicht die volle Anzahl der mitotischen Zellen erfaßt.
- lichtmikroskopisches Bild (Abb. 24)
Die Mitose-Zellen sind noch intensiver blau gefärbt als die G_2 - Zellen. Kern und Zytoplasma sind nicht mehr unterscheidbar.

Es treten zwei Zellformen auf:

- a) länglich gestreckte, spindelförmige Zellen gleichförmig intensiver Anfärbbarkeit (wie in Abb. 1)
- b) tintenfleck-ähnliche, stark abgekugelte Zellformen, bei denen vereinzelt noch ein schmaler, weniger intensiv gefärbter Zytoplasmasaum erkennbar ist.

Zur morphologischen Unterscheidung der Mitosezellen von abgestorbenen Zellen ist wichtig, daß erstere mehr "unruhige" Zellgrenzen haben - sich gleichsam noch im Zusammenziehen befinden - letztere einen glatten Rand aufweisen.

Abgekugelte Zellen

Nach Hinzufügen der Kollagenlösungen treten vereinzelt abgekugelte Zellen auf. Sie unterscheiden sich von den Mitose-Zellen durch ihren scharfen, glatten Rand und deutlich geringeren Durchmesser. Daß es sich hier um tatsächlich noch lebende Zellen handelt, bewiesen Versuche mit Lebend-Tot-Färbung (Trypanblau).

Tote Zellen

Sie sind leicht an den typischen Zelluntergangsformen zu erkennen. Im lichtmikroskopischen Bild erkennt man den Zelltod zuerst an den stattfindenden Kernveränderungen. Die Pyknose entsteht durch Kondensation von Chromatin: Die Kerne sind unregelmäßig geformt, verkleinert und intensiv angefärbt. Bei der folgenden Karyorrhexis zerfällt der Kern in einzelne Bruchstücke mit intensiver Basophilie - die Struktur erscheint krümelig. In der Karyolyse ist der Kern vollständig aufgelöst. Die Zellen bestehen nur noch aus intensiv gefärbtem Zytoplasma, wobei die Zellmembran sich zunehmend ausgefranst zeigt. Schließlich zerfällt auch das Zytoplasma.

II. ERGEBNISSE

Übersicht - Versuche

Tabellen Nr. = Versuchs Nr.	Ansatz	Block
1	FH ₅₈ - Kontrolle	1
2	FH ₅₈ + S I	
3	FH ₅₈ - Kontrolle	2
4	FH ₅₈ + S I	
5	FH ₅₈ - Kontrolle	3
6	FH ₅₈ + S II	
7	FH ₅₈ - Kontrolle	4
8	FH ₅₈ + S I	
9	FH ₅₈ + S II	
10	FH ₅₈ + S III	
11	FH ₅₈ + S IV	
12	FH ₅₈ + S V	
13	FH ₅₈ - Kontrolle	5
14	FH ₅₈ + S I	
15	FH ₅₈ + S II	
16	FH ₅₈ + S III	
17	FH ₅₈ + S IV	
18	FH ₅₈ + S V	
19	FH ₆₆ - Kontrolle	6
20	FH ₆₆ + S I	
21	FH ₆₆ - Kontrolle	7
22	FH ₆₆ + S I	
23	FH ₆₆ + Typ IV	

Die Versuche 1 mit 3 standen am Anfang meiner Untersuchungen. Sie dienten lediglich dem Ziel, die grundlegenden Verschiebungen in der prozentualen Zellzyklusverteilung aufzudecken. Daher sind keine Standardabweichungen angegeben.

Block 1

Abbildung 1 - FH₅₈ - Kontrolle

zeigt für die G₁ - Phasen einen nahezu geradlinigen Verlauf des Graphen mit leichtem Abfall gegen 48 Stunden. Die S - Phasen liegen mit fallender Tendenz unter der Zehn-Prozent-Marke. Die in G₂ + M zusammengefaßten Zellen mit tetraploiden DNA Kerninhalt nehmen, ausgehend von 8,1 % auf 15,7 % zu. Ihr Anteil hat sich also nach 48 Stunden fast verdoppelt. Vereinzelte tote Zellen spielen keine bedeutende Rolle.

Abbildung 2 - FH₅₈ + S I

gibt die Verhältnisse unter Zusatz der Kollagen-S I-Lösung wider. Besonders interessant sind vier auftretende Verschiebungen:

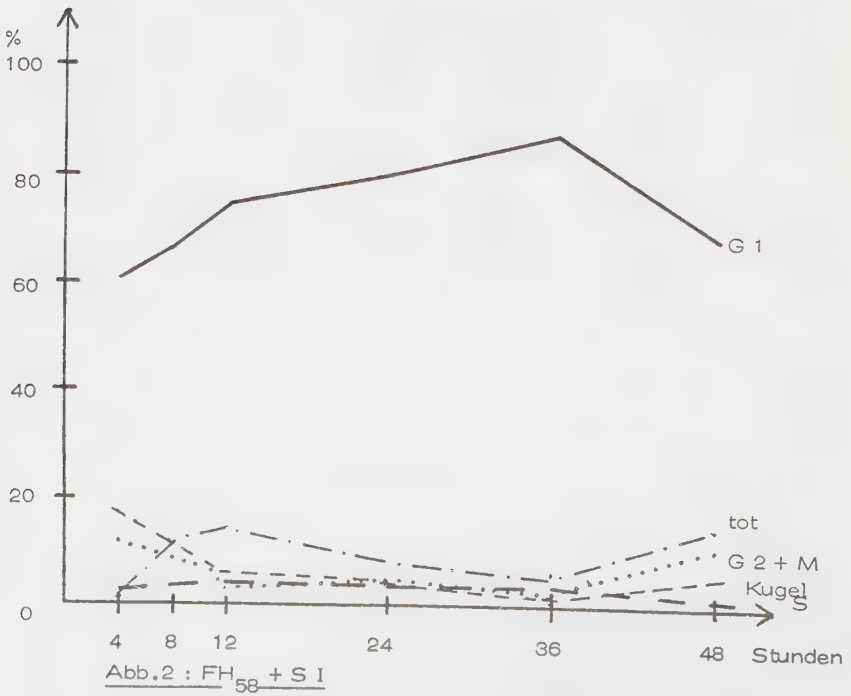
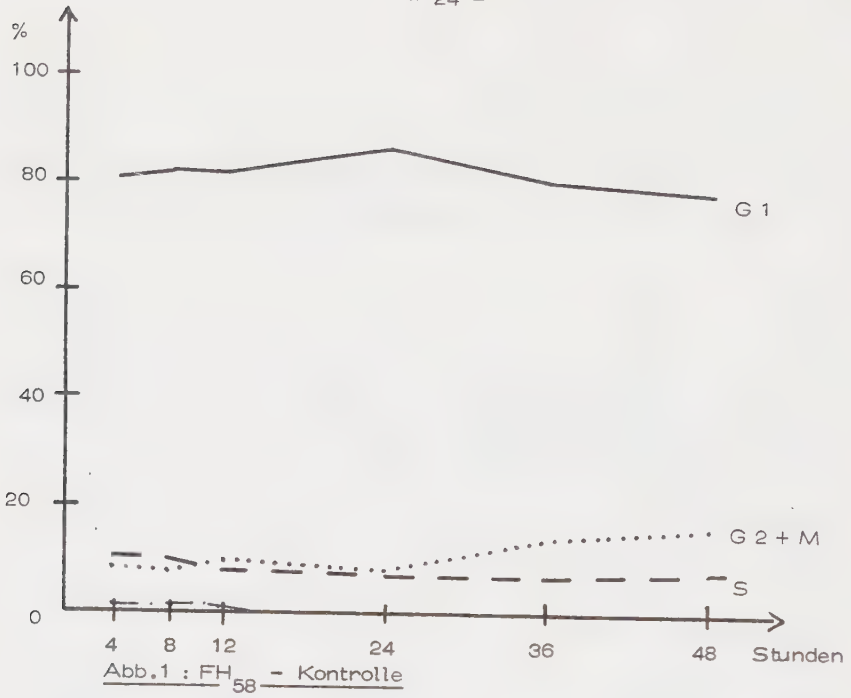
- a) Der Anteil der G₁ - Zellen ist geringer.
- b) Der Anteil der G₂ + M Zellen ist nach 8 Stunden gravierend abgefallen.
- c) Die Zahl der toten Zellen ist beträchtlich angewachsen.
- d) Erstmals treten von uns als "abgekugelte Zellen" bezeichnete Zellbilder auf, die auf den ersten Blick leicht mit mitotischen Zellen verwechselt werden können (siehe Morphologie).

Tabelle 1 FH_{58} - Kontrolle

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot
4	81,1	9,8	8,1	1
4	81,5	10,1	7,4	1
12	82,4	8,0	9,1	0,5
24	86,3	6,7	7,5	
36	80,0	6,5	13,5	
48	77,4	6,9	15,7	

Tabelle 2 $\text{FH}_{58} + \text{S I}$

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot	Kugel
4	60,1	2,0	12,5	7,9	17,5
8	66,5	3,2	8,3	11,0	11,0
12	74,2	3,5	2,5	13,9	5,9
24	80,0	3,1	3,9	8,5	4,5
36	87,3	3,5	2,2	5,0	2,0
48	68,4	0,9	11,7	14,2	4,8



Block 2

Abbildung 3 FH₅₈ - Kontrolle

Die G₁ - Phasen halten zwischen 70 und 80 Prozent den größten Anteil der Zellpopulation. Die S - Phasen pendeln sich nach 12 Stunden gegen 20 Prozent ein, und liegen damit etwa doppelt so hoch wie die G₂ + M - Phasen.

Abbildung 4 FH₅₈ + S I

Diese Versuchsreihe zeigt gegenüber allen anderen starke Abweichungen. Um das labile Gleichgewicht der Zellen in ihrem Zyklus aufzuzeigen, wird sie dennoch vorgestellt: Die Zahl der toten Zellen klettert mit zunehmender Versuchsdauer beständig, und erreicht bei 48 Stunden die 30-Prozent-Marke. Die Ursache des Absterbens von fast einem Drittel der Population blieb unbekannt. Jedenfalls überwiegt hier - unter Zusatz von Kollagen-S I-Lösung - der Anteil der tetraploiden, 4 n-DNA haltigen, Zellen den der G₂ + M Zellen im Kontroll Ansatz. Es scheint, als ob die Zellen in der G₂ - Phase auflaufen, nicht in die Mitose gehen und schließlich absterben.

Tabelle 3 FH_{58} - Kontrolle

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot
4	82,5	6,2	9,3	2,0
8	76,6	12,5	8,9	2,0
12	68,1	19,0	12,9	-
24	72,4	16,9	9,5	1,2
36	68,4	19,7	10,9	1,0
48	69,2	19,2	10,7	0,9

Tabelle 4 $FH_{58} + S I$

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot	Kugel
4	45,4	1,0	19,0	16,0	18,5
8	60,2	3,2	18,1	11,2	7,3
12	52,2	5,0	14,9	14,8	13,1
24	57,7	15,1	13,1	12,1	2,2
36	41,2	12,5	22,3	20,5	3,5
48	42,0	12,6	14,6	28,3	2,5

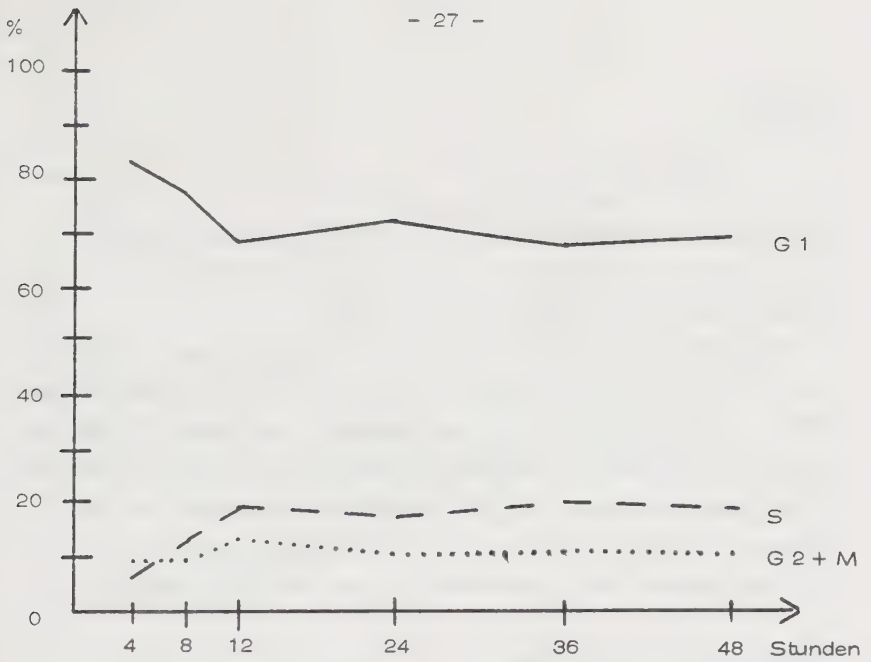


Abb. 3 : FH₅₈ - Kontrolle

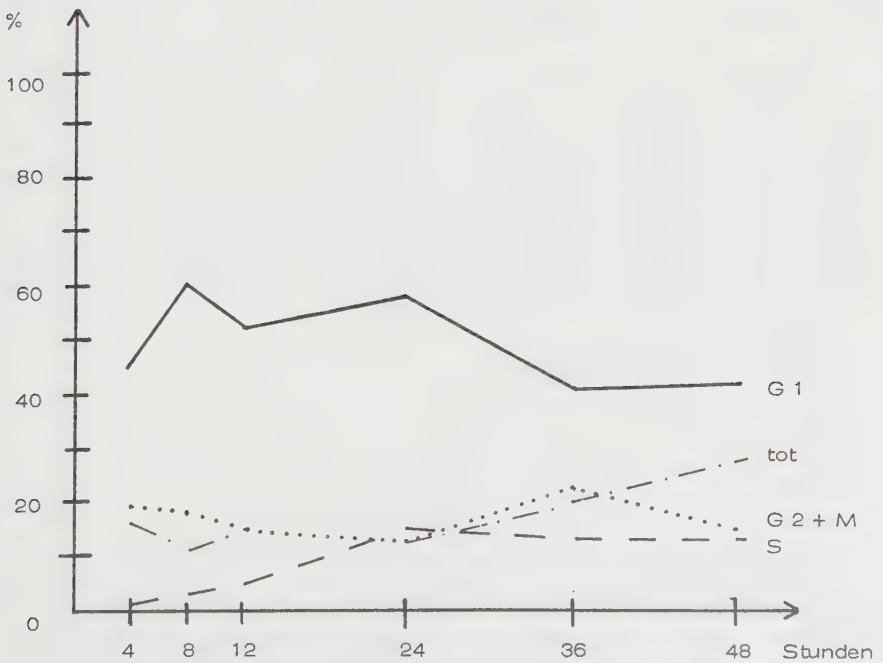


Abb. 4 : FH₅₈ + S I

Block 3

Abbildung 5 FH_{58} - Kontrolle

Abbildung 6 FH_{58} + S II

Auch hier ist die Rate der G_1 - Zellen unter Kollagenzusatz - diesmal S II - Lösung - geringer als im Kontrollansatz.

Ähnliches gilt in Bezug auf die S - Phase.

Die Fraktion der G_2 - Zellen wurde im Versuch 6 zusätzlich getrennt von den Mitosen aufgelistet. Dabei ergibt sich wiederum ein Abfall in dem G_2 Anteil, der zeitverschoben nach halber Versuchsdauer (24 h) einsetzt. Interessanterweise näherten sich die Mitosen ab der 36. Stunde dem Wert 0. Gleichzeitig erreichen die abgestorbenen Zellen ein Maximum von immerhin 44 Prozent.

Die abgekugelten Zellen schwanken um die 5-Prozent-Marke.

Tabelle 5 FH_{58} - Kontrolle

h	G_1	S	$\text{G}_2 + \text{M}$	tot
4	79,0	4,2	15,8	1
8	83,2	7,9	7,9	1
12	85,1	9,0	5,9	
24	75,4	12,9	11,7	
36	68,8	20,1	11,1	
48	69,2	19,8	11,0	

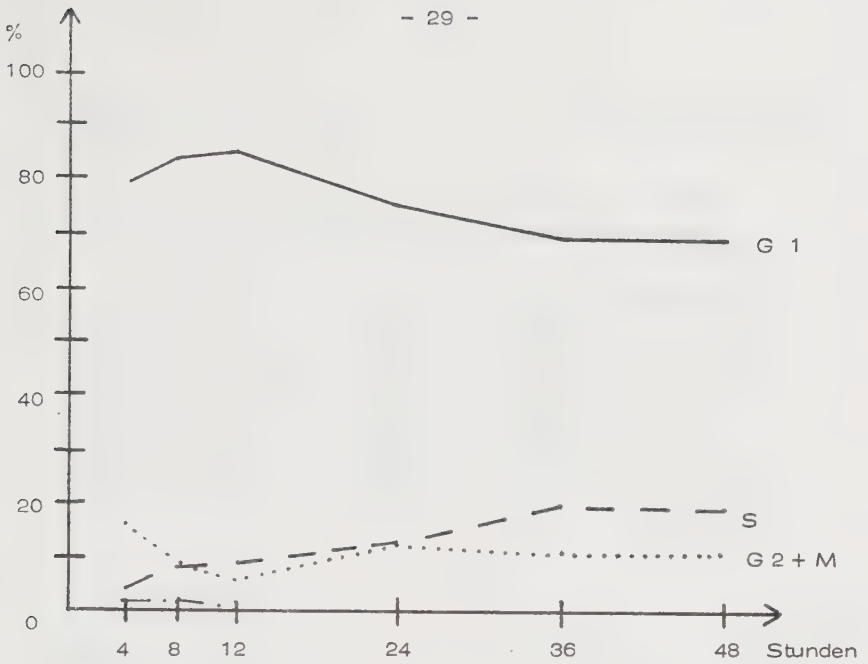


Abb. 5 : FH₅₈ - Kontrolle

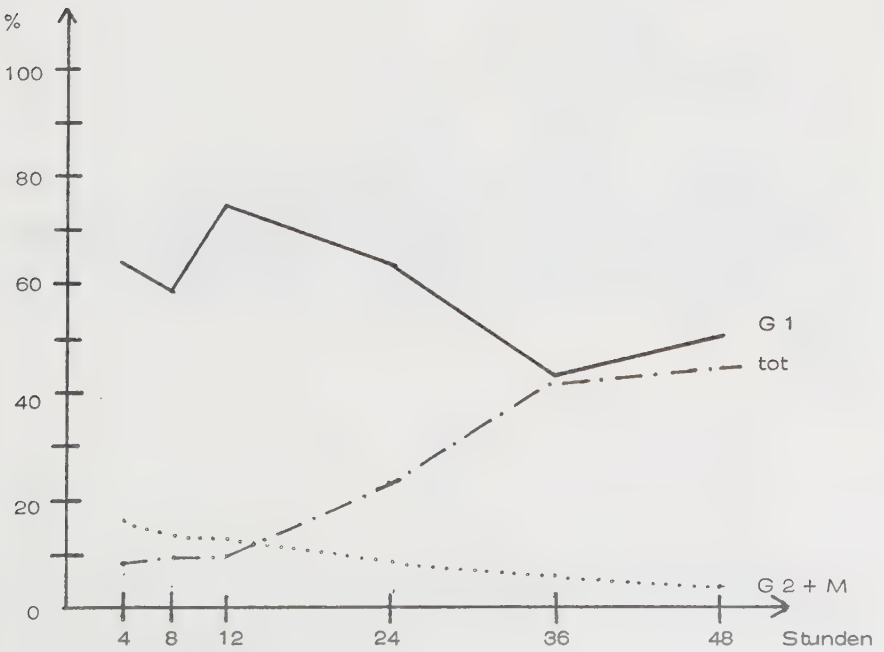


Abb. 6 : FH₅₈ + S II

Tabelle 6 $\text{FH}_{58} + \text{S II}$

h	G_1	S	$G_2 + M$	M	tot	Kugel
4	63,8	6,0	15,9	6,0	8,1	6,2
8	57,5	14,8	12,7	4,5	8,5	6,5
12	73,6	1,5	12,6	5,1	9,0	3,3
24	63,5	2,4	7,2	1,9	22,4	4,5
36	43,1	2,0	6,3	0	43,5	5,1
48	50,0	6,2	3,8	1,0	43,9	3,7

Block 4

Abbildung 7 FH_{58} - Kontrolle

Abbildung 8 $\text{FH}_{58} + \text{S I}$

Abbildung 9 $\text{FH}_{58} + \text{S II}$

Abbildung 10 $\text{FH}_{58} + \text{S III}$

Abbildung 11 $\text{FH}_{58} + \text{S IV}$

Abbildung 12 $\text{FH}_{58} + \text{S V}$

Jede Abbildung bzw. Tabelle gibt die Mittelwerte aus sieben Einzelversuchen wieder. Die Zahl der abgestorbenen Zellen ist recht gering. Der Übersichtlichkeit halber werden sie in den Abbildungen nicht aufgeführt. In Klammern sind die jeweiligen Standardabweichungen angegeben.

Tabelle 7 FH_{58} - Kontrolle

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot
4	52,1 (3,0)	18,0 (1,3)	20,9 (1,6)	9,0 (0,9)
8	48,3 (2,9)	22,5 (1,3)	22,7 (1,0)	6,5 (0,5)
12	46,2 (1,4)	26,6 (1,7)	24,2 (0,9)	3,0 (0,5)
24	32,5 (2,1)	33,2 (1,2)	28,3 (0,8)	6,0 (0,9)
36	26,5 (2,7)	33,0 (1,7)	38,0 (1,1)	2,5 (1,2)
48	23,5 (3,2)	37,5 (0,9)	36,5 (1,1)	2,5 (3,4)

Tabelle 8 $FH_{58} + S I$

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot
4	72,5 (1,9)	14,0 (0,4)	10,5 (0,9)	3,0 (0,7)
8	70,5 (3,5)	13,8 (0,2)	11,2 (0,6)	4,5 (1,3)
12	72,2 (1,9)	12,1 (0,4)	11,7 (1,5)	4,0 (0,8)
24	70,5 (2,3)	10,0 (0,6)	14,5 (1,4)	5,0 (1,6)
36	67,6 (8,5)	10,5 (0,5)	16,9 (0,9)	5,0 (4,0)
48	65,4 (6,9)	8,7 (0,7)	20,9 (1,0)	5,0 (8,9)

Tabelle 9 FH₅₈ + S II

h	G ₁	S	G ₂ + M	tot
4	70,0 (1,7)	10,5 (0,9)	17,0 (1,0)	2,5 (0,4)
8	67,4 (3,8)	14,1 (0,5)	17,5 (0,7)	1,0 (0,4)
12	68,5 (1,7)	10,4 (0,9)	19,6 (0,9)	1,5 (0,8)
24	63,5 (0,8)	12,6 (0,5)	22,9 (1,1)	1,0 (0,7)
36	61,5 (2,3)	14,5 (0,3)	21,5 (0,6)	2,5 (1,4)
48	65,0 (3,5)	13,0 (0,4)	20,5 (1,1)	1,5 (3,7)

Tabelle 10 FH₅₈ + S III

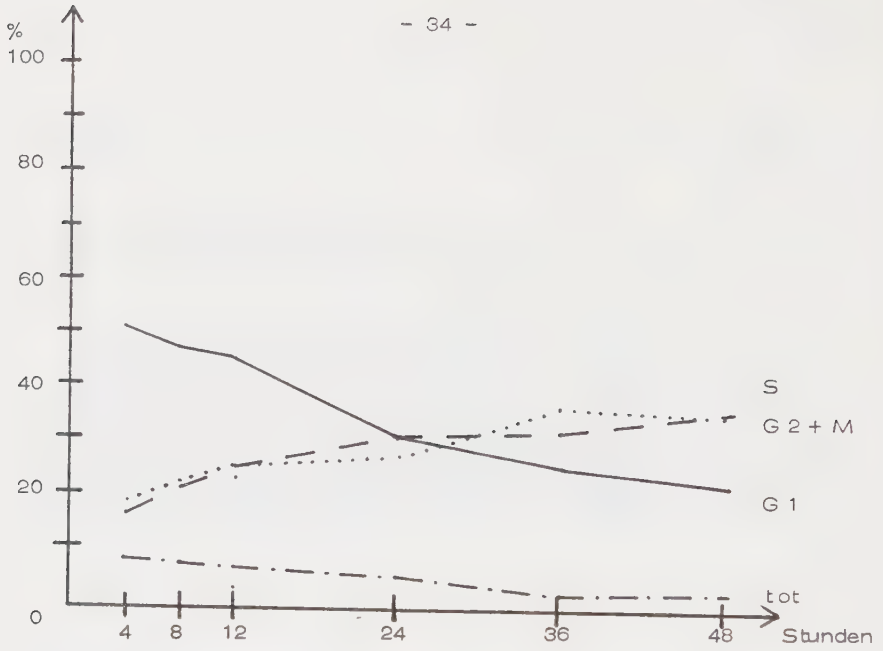
h	G ₁	S	G ₂ + M	tot
4	70,5 (1,8)	18,2 (1,4)	7,8 (0,3)	3,5 (0,6)
8	71,0 (1,4)	16,0 (0,7)	10,5 (0,5)	2,5 (0,6)
12	71,0 (1,3)	13,1 (0,7)	11,9 (0,4)*	4,0 (0,7)
24	69,8 (1,7)	8,0 (0,7)	17,2 (0,9)	5,0 (0,2)
36	67,5 (3,5)	7,6 (0,6)	21,4 (0,6)	3,5 (0,5)
48	70,0 (1,5)	7,5 (0,4)	18,0 (0,6)	4,5 (0,3)

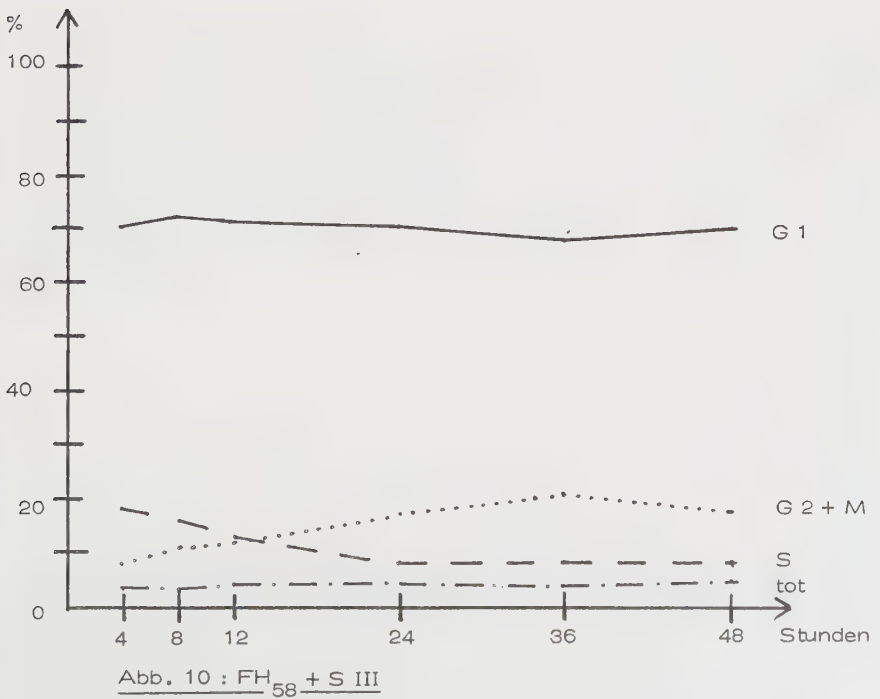
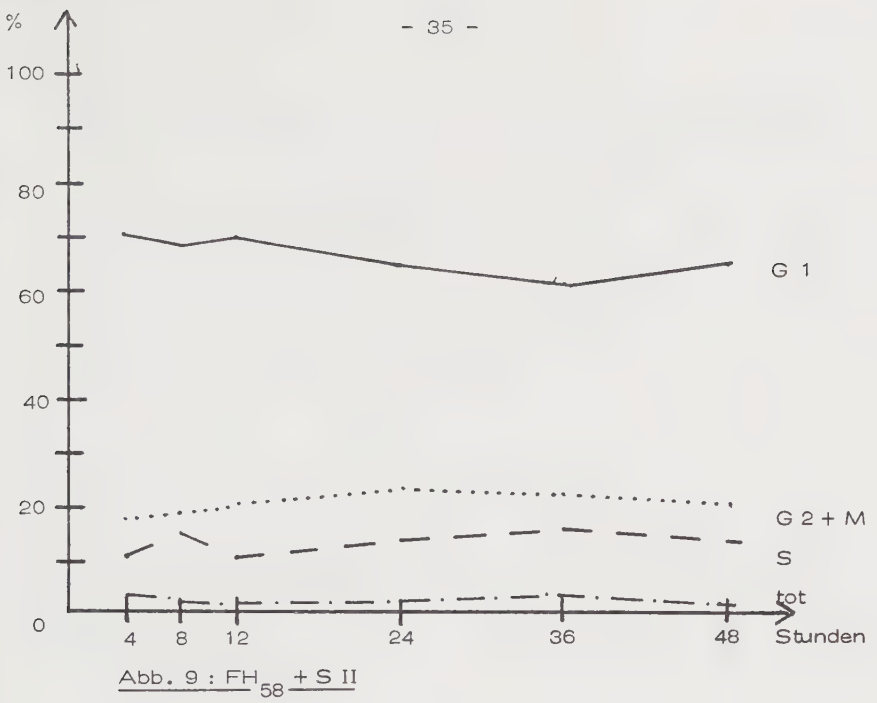
Tabelle 11 $\text{FH}_{58} + \text{S IV}$

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot
4	79,5 (0,9)	8,0 (0,4)	8,5 (1,0)	4,0 (0,7)
8	79,0 (0,7)	10,3 (0,3)	8,2 (0,7)	2,5 (0,5)
12	78,3 (1,7)	8,6 (0,6)	9,6 (1,0)	3,5 (0,8)
24	72,0 (0,7)	3,6 (0,3)	19,4 (1,1)	5,0 (1,3)
36	70,5 (0,8)	4,5 (0,3)	21,4 (0,6)	3,6 (0,7)
48	70,6 (1,1)	3,0 (0,2)	22,9 (0,6)	3,5 (1,0)

Tabelle 12 $\text{FH}_{58} + \text{S V}$

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot
4	69,5 (0,7)	18,5 (0,5)	9,0 (0,3)	3,0 (0,4)
8	69,0 (0,8)	17,6 (0,6)	11,4 (1,4)	2,0 (0,4)
12	72,3 (1,1)	12,4 (0,5)	12,8 (0,4)	2,5 (0,5)
24	66,5 (1,2)	7,5 (0,3)	23,5 (0,8)	2,5 (0,8)
36	70,0 (1,0)	6,3 (0,3)	21,7 (0,5)	2,0 (0,5)
48	72,5 (2,7)	4,0 (0,2)	19,5 (1,3)	4,0 (1,2)





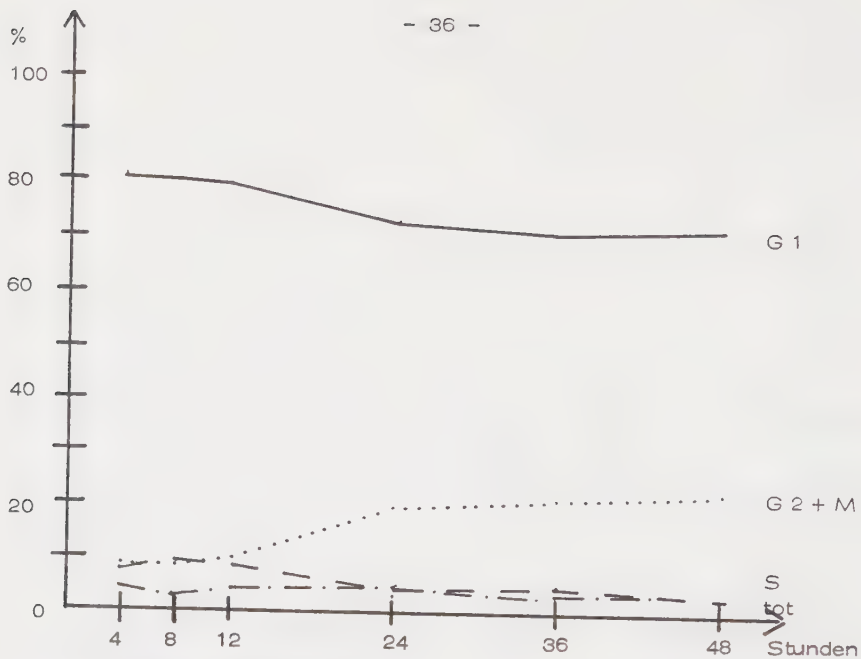


Abb. 11 : FH₅₈ + S IV

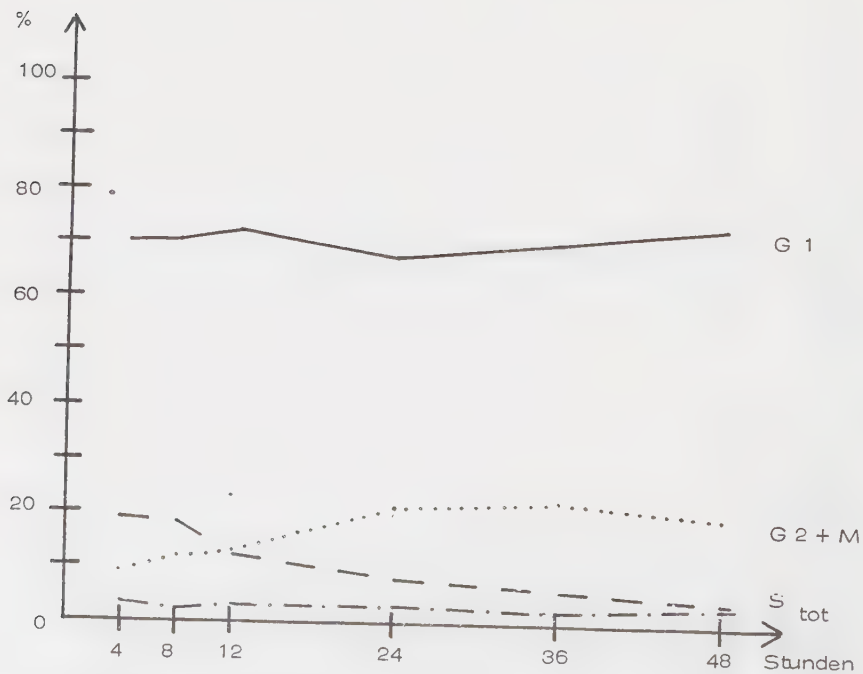


Abb. 12 : FH₅₈ + S V

Das Hinzufügen der Lösungen S I bis S V bewirkt wiederum ein deutliches Niedergehen der $G_2 + M$ - Werte, die Unterschiede zwischen den Zubereitungen S I bis S V sind nicht sehr groß. Gleichzeitig fällt auch die S - Phase von etwa 30 Prozent auf ein 10-Prozent-Niveau.

Deutlich angestiegen sind folglich die G_1 Phasen, welche Werte um die 70 Prozent Marke erreichen.

Block 5

Abbildung 13 FH_{58} - Kontrolle

Abbildung 14 $FH_{58} + S I$

Abbildung 15 $FH_{58} + S II$

Abbildung 16 $FH_{58} + S III$

Abbildung 17 $FH_{58} + S IV$

Abbildung 18 $FH_{58} + S V$

Diese Versuche wurden, um die Brauchbarkeit und Aussagekraft unseres subjektiven Zellzyklus-Differenzierungsschemas zu prüfen, von zwei Personen unabhängig voneinander ausgewertet. Es stellte sich heraus, daß die Abweichungen der zwei Ergebnisreihen im Bereich der zweifachen Standardabweichung liegen. Die im Folgenden wiedergegebenen Werte stammen aus meiner eigenen Auswertung.

Tabelle 13 FH_{58} - Kontrolle

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot
4	60,4 (5,7)	23,1 (3,7)	16,1 (8,5)	0,3 (0,5)
8	60,7 (6,7)	23,4 (3,0)	15,4 (4,0)	0,4 (0,5)
12	58,3 (7,6)	25,1 (4,0)	15,9 (4,4)	0,7 (0,9)
24	57,7 (6,1)	22,9 (4,2)	19,1 (2,9)	0,3 (1,3)
36	51,7 (7,1)	24,7 (3,6)	23,4 (4,0)	0,1 (0,4)
48	56,3 (5,0)	25,1 (3,6)	23,1 (4,8)	

Tabelle 14 $FH_{58} + S I$

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot	Kugel
4	65,4 (6,5)	5,1 (1,3)	29,4 (5,7)	-	-
8	60,7 (2,3)	3,1 (1,3)	10,7 (1,8)	6,7 (1,8)	18,7 (1,9)
12	68,1 (6,2)	4,0 (2,8)	12,0 (2,2)	5,9 (1,3)	10,4 (4,0)
24	59,1 (4,4)	3,5 (3,0)	10,0 (1,3)	7,6 (2,0)	18,7 (5,2)
36	56,6 (3,0)	4,4 (6,5)	7,8 (3,3)	19,3 (2,5)	11,6 (3,7)
48	46,9 (2,9)	3,3 (3,9)	6,3 (4,8)	31,1 (2,6)	12,6 (4,5)

Tabelle 15 $\text{FH}_{58} + \text{S II}$

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot	Kugel
4	76,0 (4,1)	5,9 (0,7)	7,2 (1,1)	1,3 (1,1)	9,6 (5,1)
8	72,4 (1,7)	3,7 (0,8)	11,6 (1,0)	1,2 (0,8)	10,6 (2,1)
12	72,6 (2,1)	4,0 (0,8)	13,4 (2,2)	3,9 (1,1)	6,1 (2,9)
24	72,0 (1,9)	3,1 (0,7)	14,0 (1,3)	6,3 (1,1)	4,6 (2,4)
36	66,6 (1,9)	2,7 (0,8)	7,0 (1,5)	21,3 (3,3)	2,4 (1,1)
48	64,1 (1,9)	4,7 (1,9)	5,0 (0,8)	23,9 (2,0)	2,3 (1,9)

Tabelle 16 $\text{FH}_{58} + \text{S III}$

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot	Kugel
4	82,7 (2,1)	7,0 (1,2)	6,3 (1,4)	1,0 (0,6)	3,0 (1,2)
8	81,6 (2,0)	5,7 (0,9)	2,4 (1,0)	2,4 (1,3)	2,0 (1,3)
12	79,3 (1,1)	5,1 (1,1)	9,9 (1,1)	1,4 (1,4)	2,7 (0,8)
24	72,7 (4,8)	5,4 (1,7)	16,3 (2,6)	4,6 (1,0)	1,0 (0,6)
36	73,3 (4,8)	2,6 (1,0)	8,1 (1,3)	15,4 (3,0)	0,6 (0,5)
48	69,7 (3,4)	2,0 (0,6)	4,6 (1,7)	23,3 (1,8)	0,4 (0,5)

Tabelle 17 $\text{FH}_{58} + \text{S IV}$

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot	Kugel
4	77,3 (2,6)	4,9 (1,2)	8,1 (0,9)	4,7 (1,4)	5,0 (1,2)
8	86,9 (1,3)	6,1 (4,9)	4,7 (1,3)	0,7 (0,5)	1,4 (0,8)
12	83,7 (2,2)	4,9 (1,2)	5,0 (2,2)	4,4 (1,0)	2,1 (1,3)
24	88,1 (2,1)	3,1 (1,1)	5,0 (2,2)	3,3 (1,8)	0,4 (0,5)
36	88,1 (3,7)	4,0 (1,8)	4,3 (1,9)	3,6 (1,9)	0,7 (0,5)
48	79,0 (2,9)	2,6 (0,8)	6,4 (1,5)	8,1 (1,7)	4,0 (1,0)

Tabelle 18 $\text{FH}_{58} + \text{S V}$

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot	Kugel
4	86,0 (3,6)	5,1 (1,3)	4,0 (1,6)	2,4 (0,5)	2,4 (1,5)
8	84,7 (1,4)	7,1 (1,6)	5,1 (1,3)	1,0 (0,6)	1,9 (0,9)
12	89,3 (2,1)	5,0 (1,4)	2,9 (0,9)	2,3 (1,1)	1,0 (0,6)
24	86,1 (1,2)	2,7 (0,8)	6,7 (0,8)	3,9 (1,3)	0,6 (0,5)
36	86,3 (2,1)	2,6 (0,8)	5,7 (0,8)	5,0 (1,8)	0,4 (0,5)
48	80,3 (1,5)	1,1 (0,4)	8,7 (0,8)	6,7 (1,1)	3,1 (1,1)

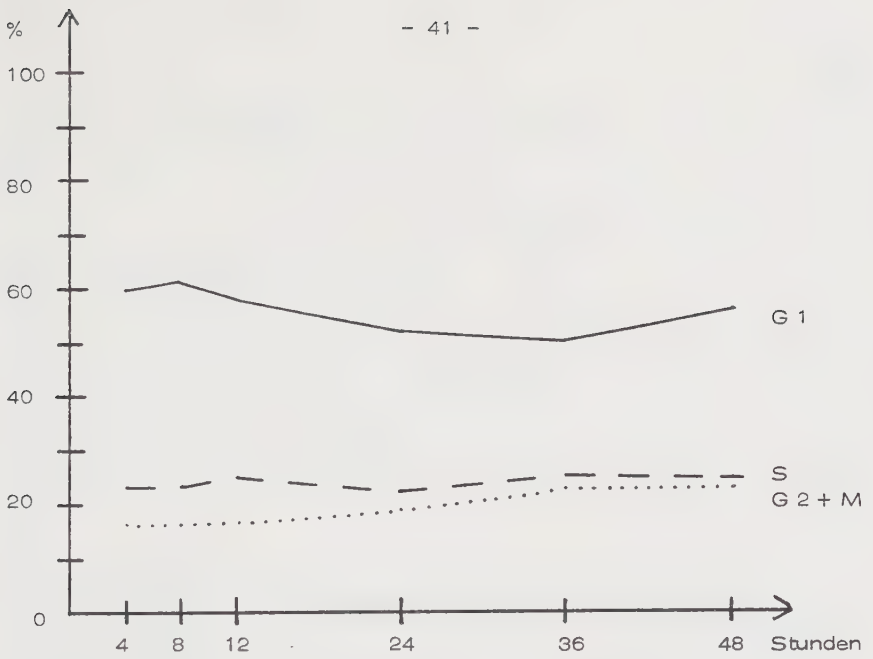


Abb. 13 : FH₅₈ - Kontrolle

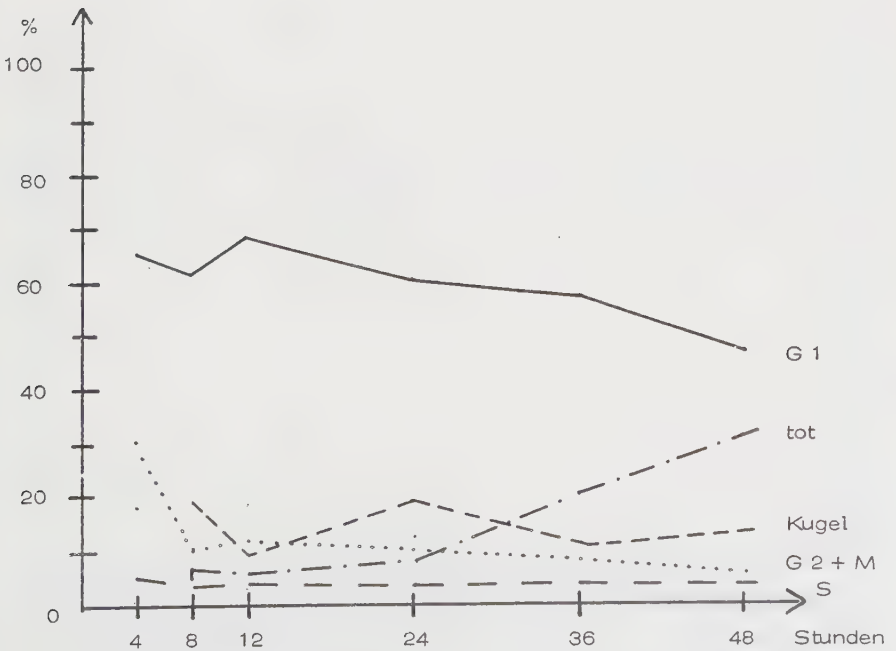
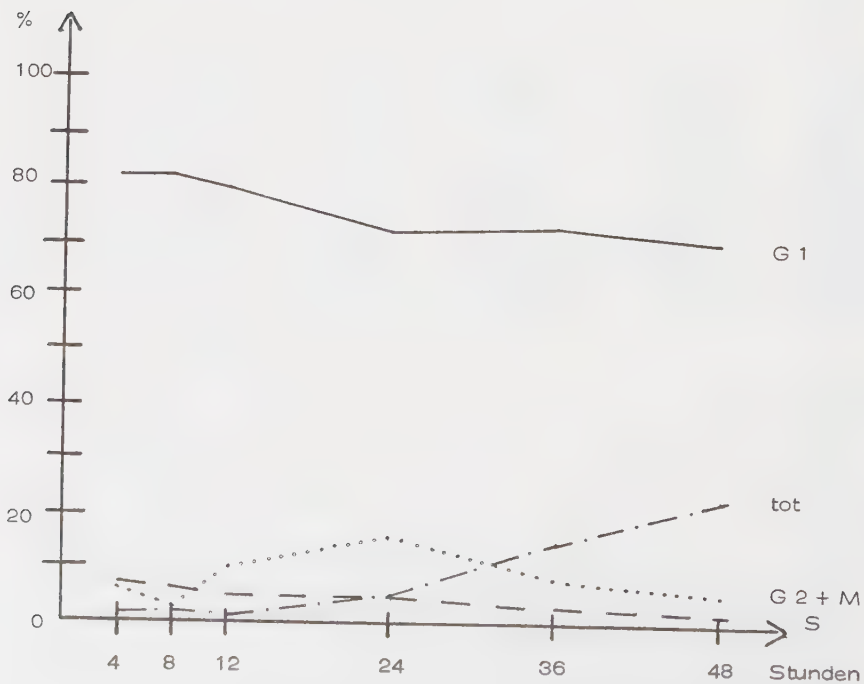
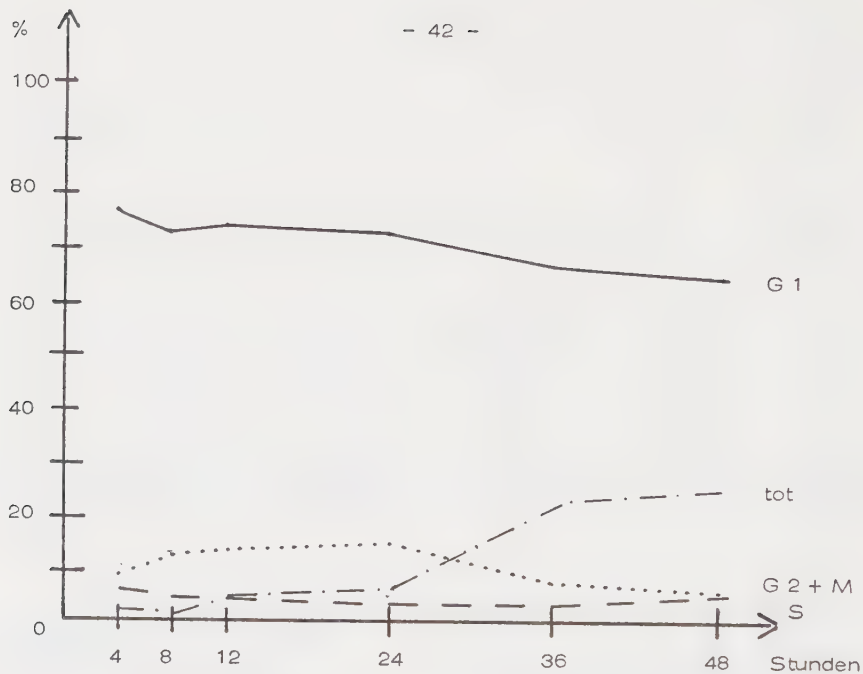


Abb. 14 : FH₅₈ + S I



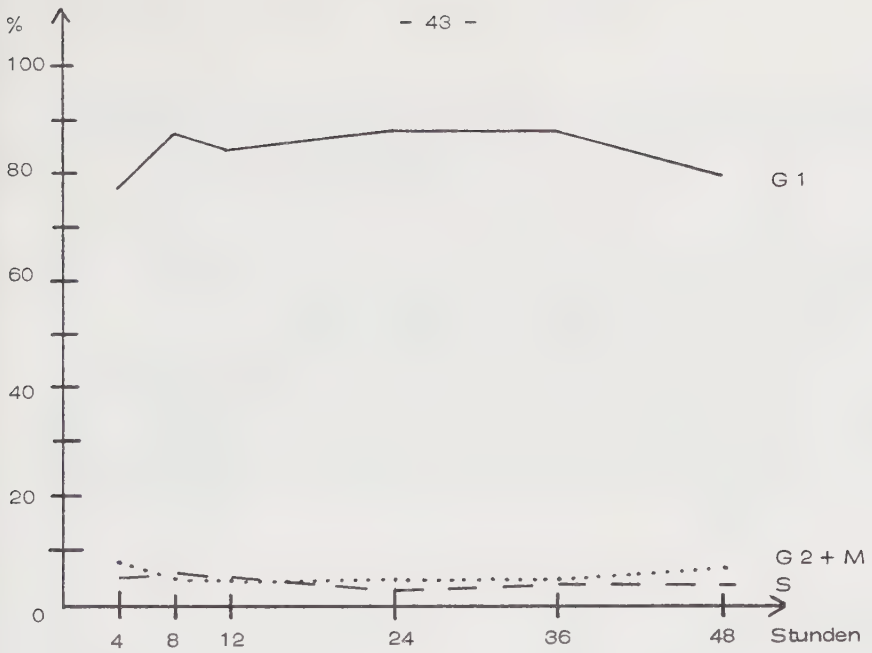


Abb. 17 : FH₅₈ + S IV

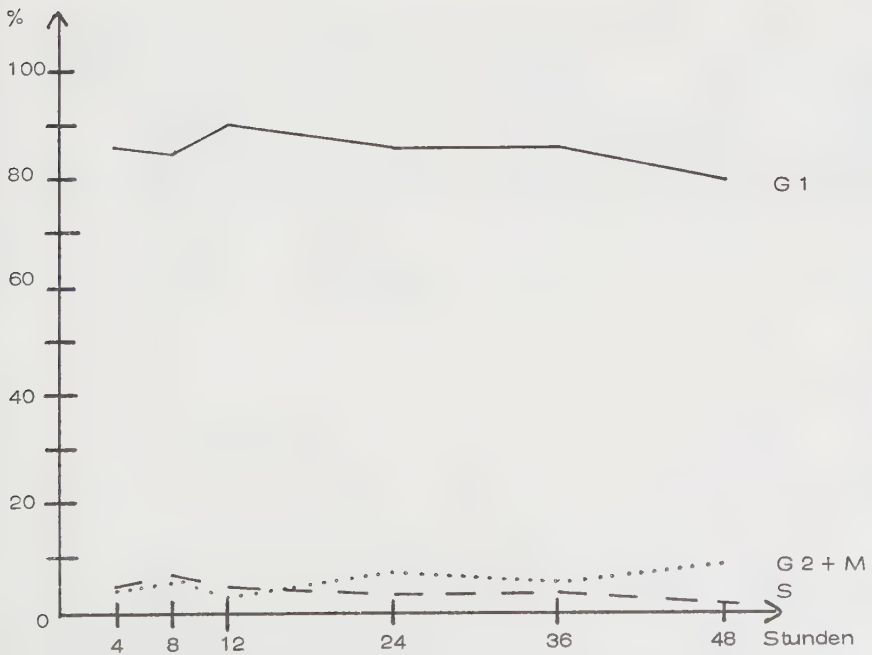


Abb. 18 : FH₅₈ + S V

Recht gute Übereinstimmung zeigen die G_2 - Phasen von S I bis S V. Sie sind gegenüber den Kontrollwerten nahezu halbiert.

Die S - Phasen sind sehr stark zurückgegangen. Sie liegen um die 5 Prozent.

Unterschiedlich ist die Rate der toten Zellen. Ihr Anstieg gegen Versuchsende bei 48 Stunden stimmt jedoch überein.

In Abbildung 14 findet unter S I Einfluß ein hervorstechender Zuwachs an Kugel-Zellen statt. Bemerkenswert ist ferner der jähe Sturz der G_2 - Phasen (30 % auf 10 %) innerhalb des Zeitraumes von 4. bis 8. Stunde sowie das geradlinige Anwachsen toter Zellen nach 24 Stunden.

Block 6

Abbildung 19 FH_{66} - Kontrolle

Abbildung 20 $FH_{66} + S I$

Zu beachten ist der in den folgenden Versuchen andere Zelllinien-Typ FH_{66} (Hautmuskel-Bindegewebe). Die prozentualen Werte dieser Reihe mögen gegenüber denen von FH_{58} parallel-verschoben sein - wichtiger erscheint jedoch, daß auch hier unter S I - Einfluß eine Regression von $G_2 + M$ zu beobachten ist.

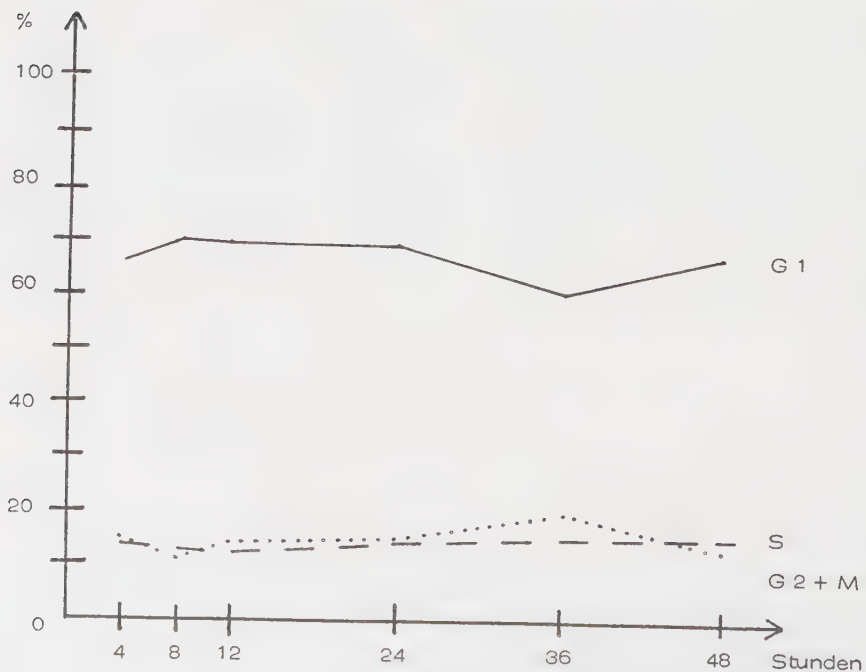
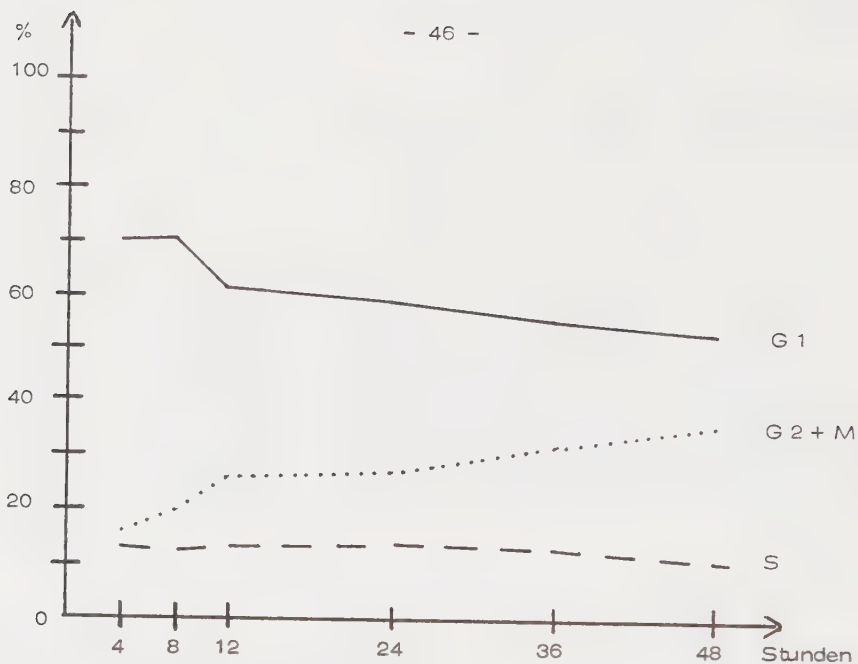
Die Anteile an kugeligen und toten Zellen sind bemerkenswert gering.

Tabelle 19 FH_{66} - Kontrolle

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot
4	70,3 (2,0)	13,2 (1,1)	16,1 (3,4)	0,4 (1,0)
8	68,2 (2,6)	11,8 (0,9)	19,7 (2,7)	0,3 (0,5)
12	60,7 (1,5)	12,5 (2,2)	26,2 (3,0)	0,6 (0,6)
24	58,2 (1,3)	14,0 (1,4)	27,3 (2,5)	0,5 (1,1)
36	55,4 (1,3)	12,8 (1,6)	31,6 (3,1)	0,2 (0,2)
48	52,8 (1,5)	11,2 (1,7)	35,7 (2,4)	0,3 (0,2)

Tabelle 20 $FH_{66} + S I$

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot	Kugel
4	65,7 (5,7)	13,4 (4,7)	15,4 (6,1)	2,3 (2,0)	3,1 (2,4)
8	70,6 (3,3)	12,9 (2,0)	11,9 (4,2)	1,3 (1,3)	3,4 (3,4)
12	68,9 (5,5)	11,9 (2,1)	14,1 (3,6)	2,8 (1,2)	2,3 (1,8)
24	68,1 (4,4)	13,8 (2,5)	15,0 (4,3)	2,0 (1,8)	1,0 (1,4)
36	60,7 (8,8)	14,7 (4,8)	19,3 (8,2)	2,7 (3,4)	2,6 (2,2)
48	67,1 (5,7)	15,4 (4,0)	13,4 (4,6)	2,7 (1,7)	1,3 (1,7)



Block VII

Abbildung 21 FH_{66} - Kontrolle

Abbildung 22 FH_{66} + S I

Abbildung 23 FH_{66} + Typ IV

Gut zu sehen sind die Rückgänge in der $G_2 + M$ - Phase zur achten Stunde (Abb. 22 und 23). Der weitere Verlauf stellt sich bemerkenswert geradlinig dar. Die Übereinstimmung der Werte von Kollagen S I - Lösung mit denen gereinigter Kollagen Typ IV - Lösung ist beachtlich.

FH_{66} - Kontrolle (Abb. 21) zeigt dem gegenüber bis zur achten Stunde einen Anstieg der $G_2 + M$ Anteile.

Tabelle 21 FH_{66} - Kontrolle

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot
4	69,2 (1,0)	13,3 (2,5)	16,7 (4,2)	0,8 (0,9)
8	67,6 (7,8)	13,0 (2,9)	19,3 (9,5)	0,3 (0,5)
12	72,3 (3,3)	12,8 (2,6)	14,7 (1,2)	0,2 (0,5)
24	72,0 (6,3)	12,5 (3,4)	12,2 (3,7)	0,2 (0,5)
36	71,7 (4,6)	12,2 (2,9)	15,3 (3,1)	0,8 (0,9)
48	67,7 (3,3)	16,3 (5,5)	14,8 (3,4)	1,3 (0,5)

Tabelle 22 $FH_{66} + S I$

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot	Kugel
4	58,3 (9,9)	16,5 (5,7)	18,5 (5,0)	1,7 (1,7)	5,0 (5,7)
8	74,8 (3,2)	11,3 (3,1)	9,3 (2,2)	3,7 (1,3)	1,0 (0,8)
12	76,8 (4,7)	10,0 (2,6)	12,0 (2,8)	1,0 (0,8)	0,3 (0,5)
24	75,3 (2,8)	12,3 (1,7)	9,8 (2,8)	2,5 (0,6)	0,3 (0,5)
36	76,8 (6,6)	11,0 (2,2)	11,5 (3,1)	0,8 (1,5)	- -
48	76,3 (3,8)	11,7 (1,5)	9,8 (3,9)	2,2 (0,9)	- -

Tabelle 23 FH + Typ IV

h	G_1	S	$G_2 + M$	tot	Kugel
4	38,5 (9,9)	18,8 (4,3)	26,3 (6,9)	1,5 (1,3)	15,0 (4,2)
8	75,5 (3,1)	10,5 (2,6)	10,0 (1,4)	0,75 (0,5)	3,3 (0,9)
12	79,0 (3,6)	10,3 (6,1)	10,3 (2,1)	0,2 (0,5)	0,2 (0,5)
24	76,8 (3,6)	12,8 (3,5)	9,3 (1,9)	1,0 (0,8)	0,8 (0,9)
36	78,5 (3,1)	13,5 (2,9)	7,3 (1,5)	0,5 (1,0)	- -
48	78,8 (2,1)	12,5 (2,6)	7,5 (0,6)	1,0 (1,2)	0,2 (0,5)

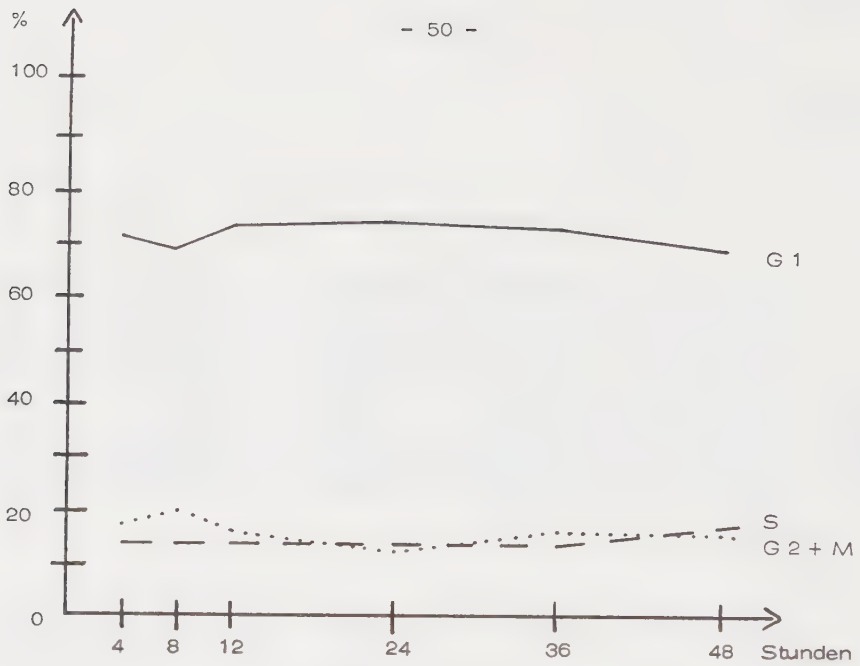


Abb. 21 : FH₆₆ - Kontrolle

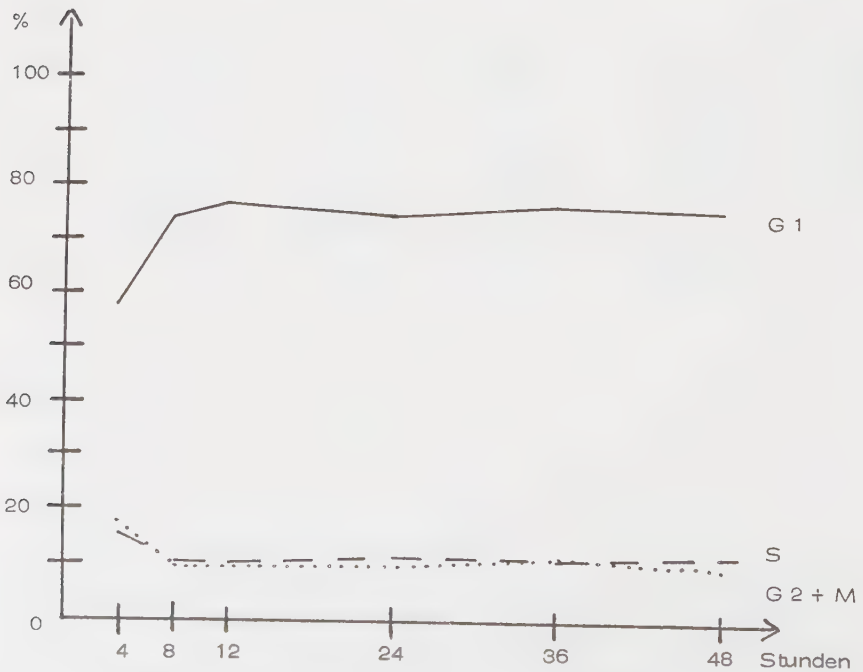


Abb. 22 : FH₆₆ + S I

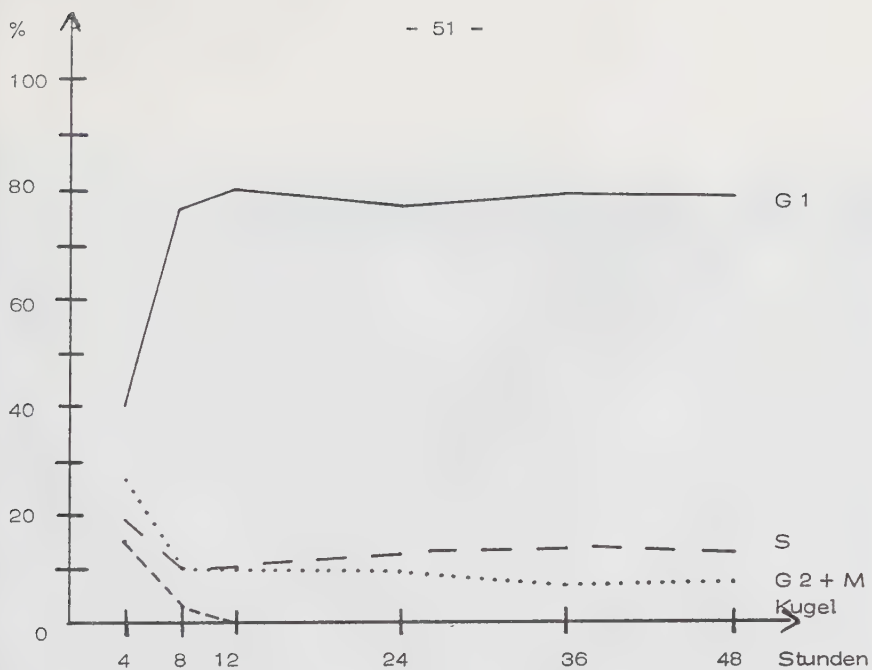


Abb. 23 : FH₆₆ + Typ IV

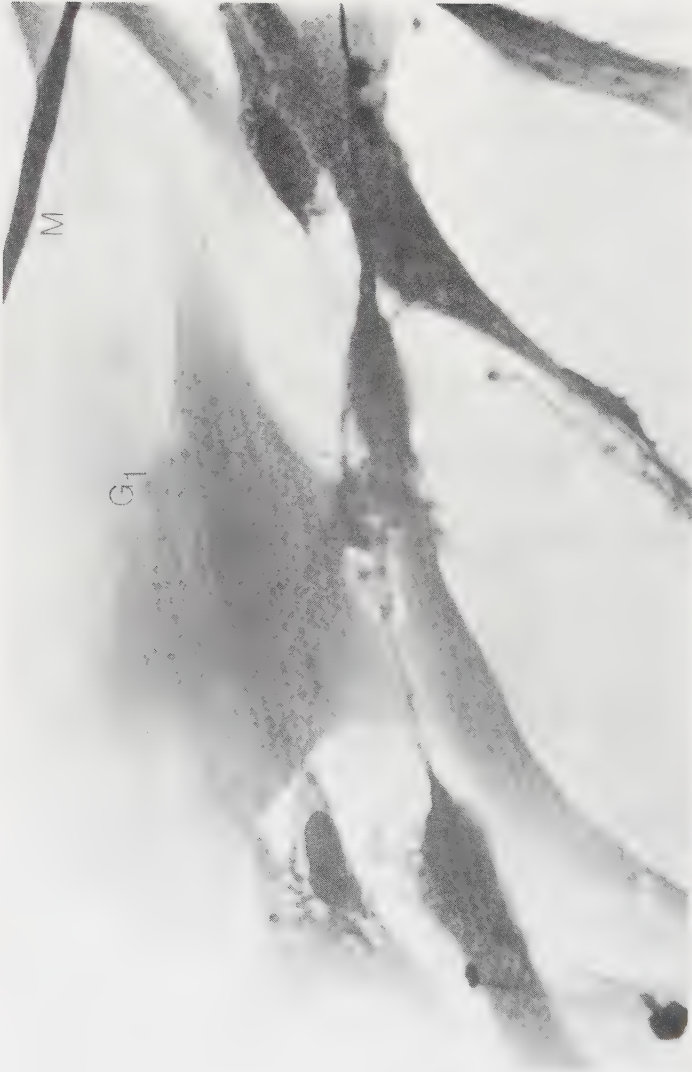


Abb. 24:

G₁ - Phasen:

Zelleib flächenhaft ausgebreitet, schaumiges Zytoplasma mit Vakuolen, nur schwache Basophilie.

Mitose:

länglich gestreckte, spindelförmige Zelle, gleichförmig intensive Anfärbbarkeit.
(700 fache Vergr.)



Abb. 25:

G₁ - Phase:

Flächenhaft ausgebreitete Zellen mit unregelmäßigen Ausläufern.

S - Phase:

typischer Zellkern mit starker, basophiler Tüpfelung, deutlichem Nukleolus und klarer Kernmembran. Im Gegensatz zur G₁ - Phase ist das Karyoplasma wesentlich stärker angefüllt.

(700 fache Vergr.)



Abb. 26:

S - Phase:
Zellkern mit Tüpfelung und zwei deutlichen Nukleoli.
G₂ - Phasen:
Zelleib Übergang in Spindelform, scharfe Umrisse; Zytoplasma mit sehr starker Basophilie dadurch innere Strukturen kaum erkennbar; Zellkern ausgeprägt tiefblaue Anfärbung, Nukleoli deutlich. Kernmembran bzw. Kern selbst wegen intensiver Anfärbung des Zytoplasmas oft nicht zu erkennen.
(700 fache Vergr.)

C. Diskussion

Nach den Ergebnissen der 23 durchgeführten Versuchsreihen zu schließen, bewirkt die Gegenwart von Kollagen im Medium von Fibroblasten-Zellkulturen deutliche Veränderungen im Zellzyklus-geschehen. Derartige Verschiebungen der Zyklusphasen können in Kulturen ohne Kollagen-Zusatz nicht beobachtet werden.

Die G_1 - Phasen - Werte der Kontrollansätze (Abb. 7, Abb. 13, Abb. 19, Abb. 21) nehmen mit der Versuchsdauer mehr und mehr ab. Demgegenüber sieht man unter Kollageneinfluß ein deutlich höheres G_1 - Phasen - Niveau (Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10, Abb. 11, Abb. 12, Abb. 15, Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18). Die Kollagen - G_1 - Phasen sind darüberhinaus hinsichtlich des zeitlichen Ablaufes nahezu konstant, große Schwankungen der Werte treten also nicht auf.

Bezogen auf den Zellzyklus bedeutet dies - gleichbleibende Generationszeiten vorausgesetzt - eine zeitliche Verlängerung der G_1 - Phase durch Kollagen.

Am hervorstechendsten ist der Wandel in der G_2 - Phase. Hier ist nach Zusatz von Kollagen-Lösungen die prozentuale Rate aller G_2 - Zellen deutlich herabgesetzt. Wie die Kurvenverläufe der Graphen für $G_2 + M$ zeigen (Abb. 2, Abb. 6, Abb. 14, Abb. 17, Abb. 22, Abb. 23) ist der Rückgang innerhalb der ersten vier bis acht Stunden am deutlichsten ausgeprägt. In der weiteren zeitlichen Entwicklung sehen wir relativ gleichmäßige und konstante Verhältnisse. Der einmal erreichte $G_2 + M$ - Phasen - Level wird im wesentlichen beibehalten. In einigen Fällen (Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10, Abb. 11, Abb. 12) setzt die $G_2 + M$ Rate sogleich stark erniedrigt ein, und erholt sich sodann im Laufe von 48 Stunden sogar etwas. In keinem der Fälle werden jedoch die Prozent-Punkte der Kontrollansätze auch nur annähernd erreicht.

Die eigentliche Ursache dieser G_2 - Regression durch Kollagen kann mit meiner Versuchsanordnung natürlich nicht ergründet werden. In der Literatur fanden sich keine Hinweise, die eine solche Veränderung beschreiben, geschweige denn erklären.

Der zeitliche Ablauf des Fibroblasten-Zellzyklus ist dagegen genau erforscht (Schwarzacher H.G., Schnedl W., 1965). Erstmalige genaue Bestimmung gelang mit Hilfe der Autoradiographie. Spätere Überprüfung dieser Ergebnisse mit modernen Methoden, etwa der Impulszytrophotometrie, bestätigen im wesentlichen die angegebenen Zeiträume (Latt S.A., George Y.S., Gray J.W., 1977 oder Reddy S.B., Erbe W., Linden W.A., Landen H., Baigent C., 1973).

Die S - Phase dauert etwa 9 Stunden, die G_2 - Phase 5 Stunden und die Mitose 1 - 2 Stunden.

Die G_1 - Phasen - Dauer ist sehr variabel. Sie soll mindestens 6, und bis zu 24 Stunden betragen.

Die unterschiedlichen Generationszeiten für Fibroblasten gründen sich also in den schwankenden G_1 - Zeiten.

Prozentuale Angaben über die einzelnen Zellzyklus Anteile sind daher recht unterschiedlich. Sind die zu Grunde gelegten Generationszeiten verschieden, können die erhaltenen Prozent-Werte nicht miteinander verglichen werden. Deshalb konnte in meinen Versuchen auch nicht auf die umständlich erscheinende, jedesmal erneut durchgeführte Bestimmung des Kontrollansatzes verzichtet werden. Es ist anzunehmen, daß die Fibroblasten-Generationszeit nicht von Passage zu Passage gleich bleibt, folglich müssen sich die Prozentangaben mitverschieben. Nur der direkte Vergleich innerhalb eines Versuchsblockes ist also aussagekräftig, denn hier handelt es sich um Zellen mit identischen Eigenschaften.

Schon das Umsetzen der Zellkulturen in neue Gefäße bewirkt eine prozentuale Umverteilung. Schnedl (1969) beobachtete 24 Stunden später ein deutliches Maximum in der Mitosehäufigkeit. Dieser Synchronisationseffekt steht in Einklang mit den Ergebnissen von Terasima und Tolmach (1963).

20 Stunden nach dem Umsetzen fanden sich in:

G_1	35 %	
S	59 %	der Zellen
G_2	6 %	

24 Stunden später:

G_1	87 %	
S	10,5 %	der Zellen
G_2	2,5 %	

Befanden sich bei 20 h noch mehr als die Hälfte aller Zellen in der DNA Synthese, so sind es bei 48 h nur noch 10 %.

Die zeitliche Konstanz von S und G_2 - Phase soll auch unter den verschiedensten Kulturbedingungen gewahrt bleiben (Sisken J.E., Kinoshita R., 1961). Schnedl folgerte aus der Unabhängigkeit der G_2 - Phase von der Generationszeit, daß schnell wachsende Kulturen relativ höhere, langsam wachsende relativ niedrige G_2 - Werte aufweisen.

Die Zusammenhänge verdeutlicht das nachfolgende Schema:

schnell wachsend: Generationszeit ↓	langsam wachsend: Generationszeit ↑
G_1 - Dauer ↓	G_1 - Dauer ↑
G_2 - Prozent - Zahl ↑	G_2 - Prozent - Zahl ↓

Nach dem Gesagten bedeutete nun der Rückgang der G_2 - Werte unter Kollagen zweierlei:

- 1.) Die G_1 - Phase der Fibroblasten wird ausgedehnt
- 2.) Die Generationszeit der Zellen ist verlängert.

Es wäre interessant zu erfahren, ob dieser Sachverhalt durch direkte Bestimmung der $G_1 - S - G_2 + M$ und Generationszeiten - sei es nun mit Hilfe der Autoradiographie oder durch Impulszytometrie nach geeigneter DNA Anfärbung - bestätigt werden kann.

D. Zusammenfassung

Die Veränderungen des Zellzyklus humaner Fibroblasten, hervorgerufen durch Kollagenlösungen werden beobachtet und beschrieben. Dazu werden Zellkulturreihen ohne und mit Kollagenzusatz angelegt, ihre Zellen anteilig nach dem Zellzyklus in G_1 , S und $G_2 + M$ Phasen bestimmt und eingeordnet. Der Verlauf wird über 48 Stunden betrachtet. Die Auswertung erfolgt unter dem Lichtmikroskop nach morphologischen Charakteristika der einzelnen Zyklusphasen. Anhand von 23 Graphiken werden die Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

Zwei deutliche Verschiebungen des Zellzyklusbildes treten unter Kollagenzusatz auf:

Erstens: Die G_1 - Phase nimmt numerisch zu.

Zweitens: Hervorstechender Rückgang der $G_2 + M$ Phase.

Diese beiden Beobachtungen werden in allen Versuchsansätzen unabhängig voneinander gemacht.

Wegen der in der Literatur bisher immer übereinstimmend beschriebenen Konstanz der G_2 - Phase, auch unter der verschiedensten Kulturbedingungen, wird eine Verlängerung der G_1 - Phasen - Zeit vermutet.

E. Summary

The changes in cell-cycle behaviour of human fibroblasts caused by collagenous solutions were examined and described. To serve the purpose, tissue cultures were taken, one of them without and other ones with different collagenous additions. The cells were determined proportionally to G_1 , S, $G_2 + M$ phases of cell-cycle. The samples were taken after 4, 8, 12, 24 and 48 hours. Evaluation was done by light-microscope, according to morphological characteristics of the cycle phases. The results were figured in 23 graphics and discussed.

Under collagen influence two distinct changes in cell-cycle are registered:

- 1st: The number of G_1 cells increases.
- 2nd: The number of $G_2 + M$ cells decreases in comparison with collagen-free tissue cultures.

Both these results have independently been achieved in each of the test series.

As in accordance with research work already being stated, cell-cycle-time of G_2 remains constant - even under most different conditions of tissue-culture - an increase of time for the G_1 - phase is suspected.

F. Literaturverzeichnis

1. Altmann, H.W. Der Zellersatz, insbesondere an den parenchymatösen Organen
Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 15-51 (1966)
2. Altmann, H.W. (a) Der Intermitose-Kern; in: Grundlagen der Cy tologie
Hrsg. Hirsch G.C., Ruska H., Sitte P.,
Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1973, 135 ff.
3. Altmann, H.W. (b) Das Karyoplasma; in: Grundlagen der Cy tologie
Hrsg. Hirsch G.C., Ruska H., Sitte P.,
Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1973,
145 Abb. 7
4. Altmann, H.W. und Grundmann, E. Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen zur Vitalstruktur tierischer Zellkerne
Beitr. path. Anat. 115, 313-347 (1955)
5. Altmann, H.W., Stöcker, E. und Thoenens, W. Über Chromatin und DNS Synthese im Nucleolus.
Elektronenmikroskopische, autoradiographische lichtmikroskopische Untersuchungen an Leberzellen von Ratten
Z. Zellforsch. 59, 116-133 (1963)
6. Band, C.A. Ultrastructure et fonctions de la membrane nucléaire. In: Problèmes d'ultrastructures et de fonctions nucléaires.
Masson et Cie. Paris 1959
7. Buddecke, E. in: Grundriss der Biochemie 471-476
De Gruyter, Berlin-New York 4. Auflage 1974

8. Church, R.L.,
Tanzer, M.L.,
Lapiere, C.M. Identification of two distinct species of pro-collagen synthesized by a clonal line of calf dermosparactic cells.
Nature New Biol. 244, 188-190 (1973)
9. Dietel-Mauers-
berger, B. Mitotische Zellen frei im Nährmedium sus-pendiert; in: Untersuchungen an Mitosen in Kulturen der Zellstämme "L" und "Changs human liver"
Acta biol. germ. 8, 42-48 (1962)
10. Dulbecco, R.,
Vogt, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses
J. exp. Med. 99, 167 (1954)
11. Earle, W.R. A technique for adjustment of oxygen an carbon dioxide tensions, and hydrogen ion concentration, in tissue cultures planted in Carrel flasks
Arch. exp. Zellforsch. 16, 116 (1934)
12. Gay, S.,
Martin, G.R.,
Müller, P.K.,
Timpl, R.,
Kühn, K. Simultaneous syntheses of types I and III collagen by fibroblasts in culture
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73
4037-4040 (1976)
13. Howard, A.,
Pelc, S.R. Syntheses of desoxyribonucleic acid in normal an irradiated cells and its relation to chromo-some breakage
Heredity 6 (suppl.), 261-273 (1953)
14. Koburg und
Maurer Autoradiographische Untersuchungen mit (H^3), Thymidin über die Dauer der DNA-Synthese und ihren zeitlichen Verlauf bei Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus
Biochem. Biophys. Acta, 61, 229-242 (1962)

15. Latt, S.A., George, Y.S., Gray, J.W. Flow cytometric analysis of bromo deoxy uridine substituted cells stained with 33258 Hoechst
J. Histochem. Cytochem. 25, 927 ff. (1977)
16. Lichtenstein, J.R., Byers, P.H., Smith, B.D., Martin, G.R. Identification of the collagenous proteins synthesized by cultured cells from human skins.
Biochemistry 14, 1589-1594 (1975)
17. Lima-de-Faria, A., Jaworska, H. Late DNA synthesis in Heterochromatin
Nature 217, 138-142 (1968)
18. Marcus, P.I., Cieciura, S.J., Puck, T.T. Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissue
J. exp. Med. 104, 615 (1956)
19. Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B., Wittmann, G. Virologische Arbeitsmethoden
Band I, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1974
20. Müller, H.A., Die Chromozentren in den Leberzellkernen der Maus unter normalen und pathologischen Bedingungen
Erg. Path. 47, 145-185 (1966)
21. Piec, K.A. in: Biochemistry of Collagen
Plenum Press New York, 1976
22. Prockop, D.J., Dehm, P., Olsen, B.R., Berg, R., Grant, M.E., Uitto, J., Kivirikko, K.I. Recent Studies on the Biosynthesis of Collagen 311-320; in: Biology of Fibroblasts,
Academic Press New York, 1973

23. Quastler, M. The analysis of cell population kinetics;
in: cell proliferation 18-34,
ed. L.F. Lamerton + R.J.M. Fry,
Blackwell Scientific Publ. Oxford, 1963
24. Reddy, S.B. Die Dauer der Phasen im Zellzyklus von
Erbe, W., L-292-Zellen
Linden, W.A. Biophysik 10, 45 (1973), Springer,
Landen, H., Berlin 1963 f
Baigent, C.,
25. Reiffenstuhl, G. Die Impulscytophotometrie des Vaginal und
Cervikalsmears
Arch. Gyn. 211, 595 F. (1971)
26. Schnedl, W., Sexchromatin und Kerngröße im Zellzyklus.
Kombinierte Histophotometrische und auto-
radiographische Untersuchungen an mensch-
lichen Fibroblastenkulturen
Chromosoma (Berl.) 27, 421-435 (1969)
27. Schnedl, W., Nukleoluszahl und -größe während des
Schnedl, M. Zellzyklus
Zeitschr. Zellforsch. 126, 374-382 (1972)
28. Schwarzacher, H.G., Der Zellzyklus in Fibroblastenkulturen vom
Schnedl, W., Menschen
Zeitschr. Zellforsch. 67, 165-173 (1965)
29. Schwarzer, H.W., Die Entstehung mehrkerniger Zellen durch
Klinger, H.P., Amitose im Amnionepithel des Menschen und
die Aufteilung des chromosomalen Materials
auf die einzelnen Zellkerne
Zeitschr. Zellforsch. 60, 741-754 (1963)

30. Sisken, J.E., Kinoshita, R. Timing of DNS synthesis in the mitotic cycle in vitro
J. biophys. biochem. Cytol. 9, 509-518 (1961)
31. Skog, S., Eliasson, E., Eliasson, Eva Correlation between cell size and position within the division cycle in suspension cultures of Chang liver cells.
Cell tissue kinet. 12, 501-511 (1979)
32. Taylor, E.W. Relation of protein synthesis to the division cycle in mammalian cell cultures
J. cell. Biol. 19, 1-18 (1963)
33. Tschermak-Woess, E. Strukturtypen der Ruhekerne von Pflanzen und Tieren
Protoplasma V1, Springer, Wien, 1963
34. Teresima, T., Tolmach, L.J. Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa-cells
Exp. cell. Res. 30, 344 (1963)
35. van't Hof, J. RNA synthesis during G_1 , S and G_2 periods of diploid and colchicine-induced tetraploid cells in the same tissue of *Pisum*
Exp. cell. Res. 45, 638-645 (1967)
36. Walter, P., Feder, F. Über den Einfluß von nativer Kollagenlösung der Typen I, II, III und IV auf den Zellzyklus in vitro.
Institutsarbeit (unveröffentlicht), 1979

Am Ende dieser Arbeit danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. P. Walter für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Anleitung und die stets gern gewährte Unterstützung.

Danken möchte ich ebenso allen Mitarbeitern des Institutes für Tieranatomie, allen voran Herrn akad. Oberrat Dr. F.H. Feder, für ihre freundliche Beratung und Hilfe bei der Anfertigung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 4. März 1952 wurde ich, Dieter Müller, als Sohn des Dipl. Ing. Heinrich Müller und seiner Ehefrau Edith, geborene von Carnap, in Heidenheim an der Brenz geboren.

Ab 1958 besuchte ich die St. Anna Volksschule in München, sodann 1960 die Conrad-Schule in Berlin, ab 1965 das Dreilinden-Gymnasium in Berlin und ab Herbst 1965 das Klenze-Gymnasium in München. Dort erhielt ich am 8.6.1973 das Reifezeugnis.

Von 1973 bis Mitte 1975 leistete ich in der Bundeswehr meinen Wehrdienst ab. Im Wintersemester 1975/76 begann ich in München an der Ludwig-Maximilians-Universität das Studium der Tiermedizin.

Am 17.3.1978 heiratete ich Andrea Fischer.

Nach 10 Fachsemestern schloß ich am 19.12.1980 das Studium mit dem Staatsexamen ab.

Die Approbation als Tierarzt erhielt ich am 19.1.1981.

